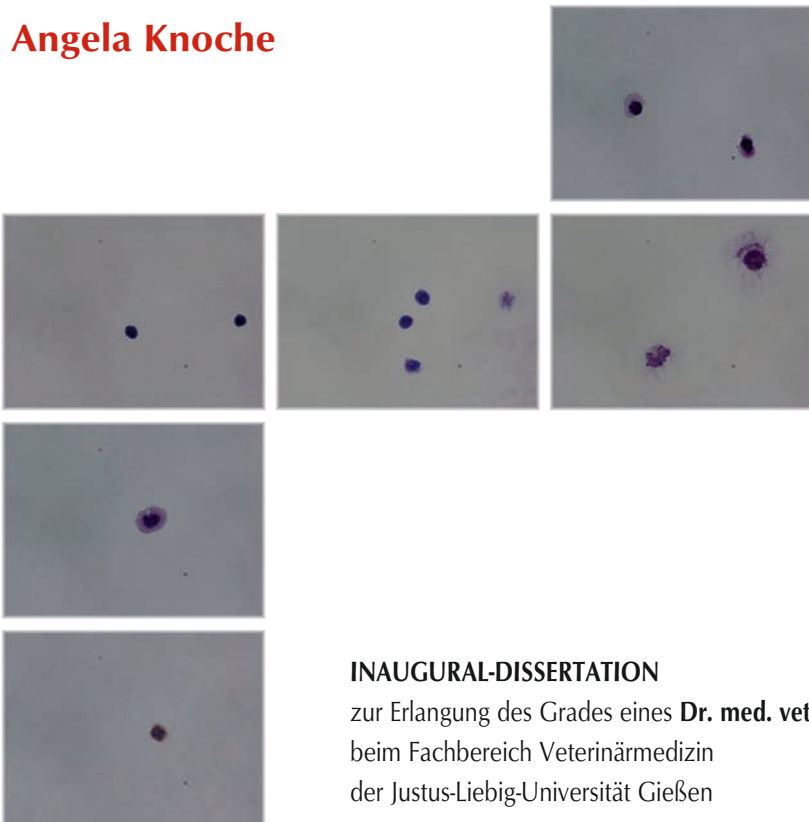


# Experimentelle Immunmodulation durch den Einsatz synthetischer Toll-like Rezeptor7- und 7/8-Liganden

---

**Angela Knoche**



## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für  
Virologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Tillmann Rümenapf

und

aus dem Zentrum für  
Transfusionsmedizin und Hämotherapie,  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Holger Hackstein

# **Experimentelle Immunmodulation durch den Einsatz synthetischer *Toll-like* Rezeptor7- und 7/8-Liganden**


INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Angela Knoche**

Tierärztin aus Marburg

Gießen 2012



Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:


Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. H. Hackstein  
Prof. Dr. T. Rümenapf

Tag der Disputation:

27.04.2012



"May the road rise to meet you on your journey,  
may the wind be at your back  
and the sun be on your face,  
and may you hold yourself in the palm of your hand  
and allow others to see you as you really are..."



<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Immunsystem</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b><i>Toll-like</i> Rezeptoren</b>	<b>3</b>
1.2.1	Die Familie der <i>Toll-like</i> Rezeptoren	3
1.2.2	Lokalisation der TLR's	4
1.2.3	TLR-Liganden	4
1.2.3.1	<i>Resiquimod (R848)</i>	6
1.2.3.2	<i>Gardiquimod</i>	6
1.2.3.3	<i>Loxoribine</i>	7
1.2.3.4	<i>Lipopolysaccharid (LPS)</i>	7
1.2.3.5	<i>CpG ODN's</i>	8
1.2.3.6	<i>iODN's</i>	9
1.2.4	Die Signalkaskade der TLR's	10
<b>1.3</b>	<b>Die dendritischen Zellen</b>	<b>12</b>
1.3.1	DC-Subpopulationen	13
1.3.2	DC-Migration und –Reifung	14
1.3.3	Aufnahme von Antigenen	15
1.3.4	DC-Aktivierung und –Reifung	16
1.3.5	Antigen-Aufarbeitung und –Präsentation	17

1.3.5.1	MHC-Klasse II	17
1.3.5.2	MHC-Klasse I	18
1.3.6	T-Zell-Aktivierung	18
1.3.7	Plastizität der dendritischen Zellen	19
<b>1.4</b>	<b>T-Zellen</b>	<b>19</b>
1.4.1	T-Zell-Subpopulationen	20
1.4.2	T-Zell-Aktivierung	21
<b>1.5</b>	<b>Verschiedene Marker-Moleküle</b>	<b>23</b>
1.5.1	HLA-DR	23
1.5.2	CD40, CD83, CD86	23
1.5.3	BDCA-2, BDCA-4, BDCA-1	23
1.5.4	CD25	24
1.5.5	CD123	24
1.5.6	CD122	25
1.5.7	FOXP3	25
<b>1.6</b>	<b>Verschiedene inflammatorische und antiinflammatorische Zytokine</b>	<b>25</b>
1.6.1	IL-1 $\beta$	25
1.6.2	IL-6	26
1.6.3	IL-8	27



1.6.4	IL-10	27
1.6.5	IL-12p70	28
1.6.6	TNF	28
<b>1.7</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>31</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>31</b>
2.1.1	Geräte	31
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	32
2.1.3	Chemikalien	33
2.1.4	Fertige Reagenziensätze	34
2.1.5	Immunmodulatoren	35
2.1.6	Zytokine	35
2.1.7	Antikörper	35
2.1.8	Computersoftware	37
2.1.9	Humanes Probenmaterial	38
2.1.10	Statistik	38
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>39</b>
2.2.1	Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC's) aus dem <i>buffy coat</i>	39

2.2.2	Separation von CD14+-Zellen mit Hilfe des <i>automated magnetic activating cell sorting</i> (AutoMACS®)	40
2.2.3	Bestimmung der Leukozytenzahl mit dem Automatischen Hämatologieanalysator KX-21N (Sysmex)	42
2.2.4	Kultivierung und Stimulation der Monozyten für die durchflusszytometrische Untersuchung	42
2.2.5	Durchflusszytometrie (FACS: <i>fluorescent activating cell sorting</i> )	43
2.2.6	T-Zell-Proliferationstest	48
2.2.7	Kultivierung und Stimulation der Monozyten für den <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA)	52
2.2.8	<i>Human Inflammatory Cytokines Cytometric Bead Array</i> (CBA)	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
<b>3.1</b>	<b>Der TLR7/8-Ligand R848 modifiziert dosisabhängig die Differenzierung konventioneller MoDC's</b>	<b>56</b>
<b>3.2</b>	<b>Die Wirkung von R848 auf die DC-Differenzierung ist TLR8 vermittelt</b>	<b>61</b>
3.2.1	Der Einfluss des spezifischen TLR7-Liganden Gardiquimod auf die DC-Differenzierung	61
3.2.2	Der Einfluss von Loxoribine, eines weiteren TLR7-Liganden, auf die DC-Differenzierung	67
3.2.3	Die Verwendung verschiedener inhibitorischer Oligonukleotide (iODN's) zur Verifizierung der TLR8-Wirkung	69

<b>3.3</b>	<b>R848-DC's exprimieren größere Mengen an T-Zell kostimulatorischen Molekülen und HLA-DR</b>	<b>72</b>
3.3.1	R848-DC's exprimieren größere Mengen an T-Zell kostimulatorischen Molekülen und HLA-DR im Vergleich zu konventionellen MoDC's	72
3.3.2	R848-DC's exprimieren CD123	78
<b>3.4</b>	<b>Die Expression von FOXP3 und CD122</b>	<b>80</b>
3.4.1	Expression von FOXP3	80
3.4.2	Expression von CD122	81
<b>3.5</b>	<b>R848-DC's zeigen auch nach dem Entfernen des Stimulators R848 einen stabilen Phänotyp</b>	<b>82</b>
<b>3.6</b>	<b>R848-DC's induzieren eine bessere T-Zell-Proliferation als konventionelle MoDC's</b>	<b>84</b>
<b>3.7</b>	<b>R848-DC's produzieren verschiedene Zytokine mit immunregulatorischen Funktionen</b>	<b>88</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>93</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression der T-Zell kostimulatorischen Moleküle CD40, CD83, CD86, HLA-DR und CD123</b>	<b>94</b>
<b>4.2</b>	<b>TLR8 als Vermittler der immunmodulatorischen Wirkung von R848 auf MoDC's</b>	<b>96</b>

<b>4.3</b>	<b>Induktion der allogenen T-Zell-Proliferation durch R848-DC's</b>	<b>97</b>
<b>4.4</b>	<b>Zytokinproduktion der R848-DC's</b>	<b>98</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b>	<b>102</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>104</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>116</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>124</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>130</b>
<b>11.</b>	<b>Publikationen</b>	<b>131</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Vielzellige Organismen sind in ihrer Umwelt ständig Fremdstoffen bzw. mikrobiellen Stoffwechselprodukten sowie pflanzlichen und tierischen Giften ausgesetzt. Im Laufe der Evolution haben sie verschiedenste Verteidigungsmechanismen entwickelt, um sich vor diesen Einflüssen zu schützen (1).

Vertebraten besitzen dazu das sog. Immunsystem, bei dem man einen angeborenen und einen erworbenen Teil unterscheidet.

Angeborenes Immunsystem		Erworbenes Immunsystem
	<u>physikalische Barrieren</u>	
Haut, Mikrovilli, Cilien im Respirationstrakt, ...		keine
	<u>humorale Komponenten</u>	
Komplementsystem, Akute Phase Proteine, Interferone, Enzyme		Immunglobuline (Antikörper)
	<u>zelluläre Komponenten</u>	
Phagozyten, NK-Zellen, Granulozyten		T- und B-Lymphozyten

**Abb. 1.1.1: Mechanismen des angeborenen und erworbenen Immunsystems.**

Bei der erworbenen Immunität, kommt es beispielsweise zu einer Reaktion zwischen spezifischen Antikörpern mit dem entsprechenden Antigen bzw. wird diese hervorgerufen durch spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten, Makrophagen oder andere immunkompetente Zellen. Hierbei spielen bei der Vermittlung komplexer Vorgänge bestimmte Übertragungssubstanzen, die Zytokine, eine wichtige Rolle. Außerdem ist das angeborene Immunsystem entscheidend an der Stimulation des erworbenen Immunsystems beteiligt.

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem reagiert das erworbene Immunsystem nicht unmittelbar.

Das angeborene Immunsystem ist der phylogenetisch ältere Teil und in allen multizellulären Organismen vorhanden. Es stellt die erste Verteidigungslinie gegen eingedrungene Mikroorganismen dar. Die Haut-Schleimhaut-Barriere, humorale Faktoren (z.B. antimikrobielle Enzyme und das Komplementsystem), sowie eine Vielzahl verschiedener Zellen garantieren die erste und unmittelbare Verteidigungslinie gegen pathogene Mikroorganismen.

Im Wesentlichen verwendet das angeborene Immunsystem 3 Strategien.

Zum einen erkennt es körpereigene Zellen, die ein verändertes Muster von Markern aufweisen. Die Zellen werden apoptotisch und dann von Makrophagen phagozytiert (*altered self*).

Weiterhin führt eine fehlende Expression von Oberflächenmarkern (z.B. werden MHC-Klasse-I-Moleküle bei infizierten kernhaltigen Körperzellen nicht mehr exprimiert) zum Töten derselben durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (*missing self*). Als dritte Strategie werden invariante Strukturen von Mikroorganismen (gram-positiven und gram-negativen Bakterien, Pilzen und Protozoen) und Viren, die sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP's), erkannt. Diese werden vom Wirt selbst nicht gebildet und stellen mikrobielle Produkte, wie LPS, hypomethylierte DNA (CpG-Motive), Flagellin, Peptide und Nukleinsäurestrukturen dar (*nonself*) (2-5).

## 1.2 *Toll-like* Rezeptoren

### 1.2.1 Die Familie der *Toll-like* Rezeptoren

Immunzellen, die dem angeborenen Immunsystem angehören, besitzen eine festgelegte Anzahl an Keimbahn-kodierten Rezeptoren, sogenannte *pattern recognition receptors* (PRR's).

Zu den PRR's zählen drei große Proteinklassen: *Toll-like receptors* (TLR's), *NOD-like receptors* (NLR's) und *RIG-like helicases* (RLH's). TLR's sind entweder an der Plasmamembran oder an vesikulären Membranen lokalisiert, wo sie diverse PAMP's von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen detektieren. NLR's stellen eine neu entstehende Familie dar, von denen einige Rezeptoren hauptsächlich PAMP's von Bakterien erkennen, die sich im Zytosol befinden. MDA5/Helicard und RIG-I gehören zu den RLH's und sind auch Zytosolrezeptoren, die allerdings virale ssRNA und dsRNA detektieren.

Haben PRR's Mikroorganismen und Viren an ihren evolutionär konservierten Strukturen (PAMP's) erkannt, führen zelluläre Signalkaskaden zu einer entsprechenden Zellantwort.

Die am besten charakterisierte Klasse der PRR's stellt die Familie der *Toll-like-receptors* (TLR's) dar (6-9).

Ursprünglich wurde das Protein *Toll* in *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo es in der Embryogenese für die dorsoventrale Polarität verantwortlich ist. 1996 fand man heraus, dass *Toll* zusätzlich wichtig für die Immunabwehr von *Drosophila* gegen Befall mit Pilzen ist. Ein Jahr später konnten "*Toll-like*"-Sequenzen auch in Vertebraten identifiziert werden (8, 10-12).

Bis heute sind bei Mäusen 13 und beim Menschen 11 verschiedene *Toll-like* Rezeptoren (TLR1-10) identifiziert worden, die alle unterschiedliche Strukturen, spezifische Strukturgruppen oder einzelne Moleküle erkennen. TLR1-9 sind zwischen Mensch und Maus konserviert. Durch Rezeptor/Ligand-Bindung induzieren TLR's verschiedene Signalkaskaden,

die wiederum eine Reihe von Zellantworten, wie die Produktion von Interferonen (IFN's) und anderen Zytokinen (z. B. Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , Interleukin (IL)-6 und IL-12) auslösen und so über verschiedene Signalkaskaden zu einer entsprechenden Entzündungsreaktion führen (8).

### **1.2.2 Lokalisation der TLR's**

TLRs liegen entweder als Monomer (TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9 und TLR10), als Heterodimer (TLR1/2 oder TLR2/6, eventuell TLR4/5) oder vermutlich auch als homologes Dimer (TLR2/2) vor. Sechs der Rezeptoren sind an der Plasmamembran lokalisiert (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10), die übrigen vier befinden sich an der Endosomenmembran (TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9) (6, 13, 14).

### **1.2.3 TLR-Liganden**

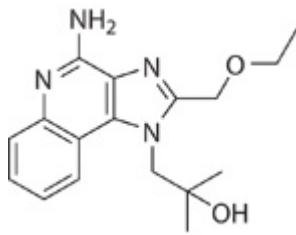
Neben einigen endogenen Liganden, die bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen können, existieren eine ganze Reihe exogener Liganden bakteriellen, viralen, fungalen bzw. parasitären Ursprungs, die bis heute identifiziert worden sind. Mittels TLR-defizienter Mäuse und Überexpressionsexperimenten mit einzelnen TLR-Genen in einfachen Zellkulturmodellen können die verschiedenen Liganden ihren jeweiligen Rezeptoren zugeordnet werden (15-19). Abb. 1.2.3.1 gibt eine Übersicht bekannter pathogen-assoziiertes, exogener Liganden wieder, die für TLR's spezifisch sind.



TLR's	Exogene Liganden
TLR1/2	(TLR1 ist funktionell assoziiert mit TLR2) triacetylierte Lipopeptide (verschiedene Bakterien und Mykobakterien), Pam3Cys (synthetisches tripalmitoyliertes Lipopeptid), 19kDa-Lipopeptid (Mykobakterien)
TLR2	Lipoarabinomannan, Lipoproteine, Zymosan, Glykolipid, äußeres Membranprotein A ( <i>K.pneumoniae</i> )
TLR3	Poly (I:C), mRNA/tRNA, doppelsträngige RNA (dsRNA)
TLR4	LPS (Lipid A), LTA, Protein F
TLR5	Flagellin (verschiedene bewegliche Bakterien)
TLR2/6	(TLR6 ist funktionell assoziiert mit TLR2) Zymosan, diacetylierte Lipopeptide (verschiedene Bakterien und Mykobakterien)
TLR7	synthetische Guanosin-Analoga, Imidazoquinolin Präparate, einzelsträngige RNA (ssRNA) aus Viren (z. B. Influenzavirus, HIV-1),
TLR8	(TLR8 nicht funktionell in der Maus) synthetische Guanosin-Analoga, Imidazoquinolin Präparate, einzelsträngige RNA (ssRNA) aus Viren (z. B HIV-1),
TLR9	unmethylierte CpG-DNA aus Viren und Bakterien
TLR10	bis heute kein Ligand identifiziert
TLR11	Profilin
TLR12	(TLR12 nur in der Maus) bis heute kein Ligand identifiziert
TLR13	(TLR13 nur in der Maus) bis heute kein Ligand identifiziert

**Abb. 1.2.3.1: Übersicht exogener TLR-Liganden im humanen und murinen System.** Dargestellt sind zur Verdeutlichung der Vielfalt der Pathogenerkennung verschiedene exogene TLR-Liganden (6, 20-21).

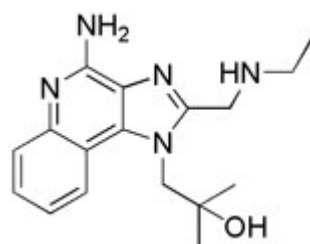
### 1.2.3.1 Resiquimod (R848)



**Abb. 1.2.3.1.1: Strukturformel von R848.**

R848 ist ein Imidazoquinolin-Bestandteil mit hoher anti-viraler Aktivität. Als synthetisches Molekül mit niedrigem Molekulargewicht aktiviert es Immunzellen auf dem TLR7/8 MyD88-abhängigen Signalweg (22-23). Eine Stimulation von TLR7 kann mit einer Konzentration von 50 ng/ml - 5 µg/ml und eine Stimulation von TLR8 mit 0,5 - 5 µg/ml erreicht werden. So moduliert es neben der Antikörpersekretion die Zytokinproduktion, schützt vor Apoptose und führt zu einer Hochregulation von CD80 (24).

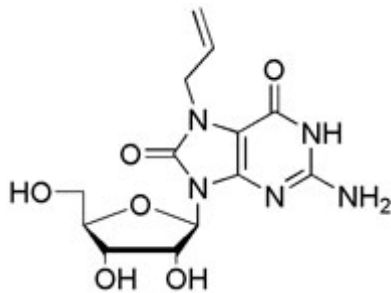
### 1.2.3.2 Gardiquimod



**Abb. 1.2.3.2.1: Strukturformel vom Gardiquimod.**

Gardiquimod ist wie R848 ein Imidazoquinolin-Bestandteil, jedoch 10 x aktiver als z.B. Imiquimod, so dass eine Konzentration von 0,1 µg/ml ausreicht, um eine NF-κB Aktivierung über TLR7 zu erzielen. Erst bei hohen Konzentrationen (3 µg/ml) aktiviert Gardiquimod auch geringfügig TLR8.

### 1.2.3.3 Loxoribine



**Abb. 1.2.3.3.1: Strukturformel von Loxoribine.**

Loxoribine ist ein Guanosin Analogon. Ähnlich wie Imidazoquinoline aktiviert Loxoribine das angeborene Immunsystem über TLR7. Die Aktivierung beruht auf einer Ansäuerung und Reifung der Endosomen (25).

### 1.2.3.4 Lipopolysaccharid (LPS)

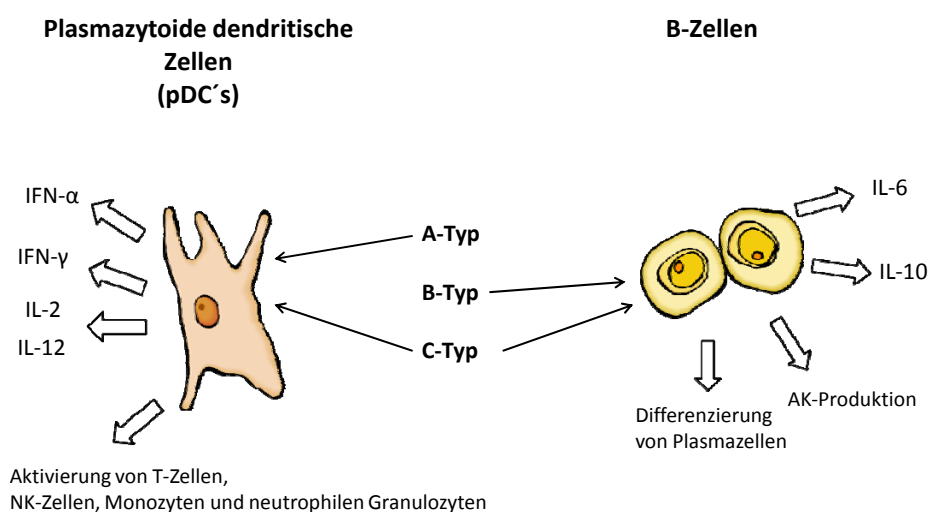
Die Zellwand der meisten gram-negativen Bakterien enthält im Gegensatz zu der gram-positiver Bakterien eine aus Lipopolysacchariden (LPS) aufgebaute Schicht. Solange diese Moleküle in der Zellwand eingebaut sind, sind sie für das Immunsystem nicht zugänglich. Erst bei der Vermehrung, dem Absterben oder der Lyse des Bakteriums werden diese Moleküle frei. Als exogener TLR4-Ligand stellt LPS das stärkste PAMP gram-negativer Bakterien dar, welches neben dem Beschleunigen von Immunantworten auf lösliche Antigene (26-27) auch pyrogene Eigenschaften besitzt.

Aufgebaut ist das LPS-Molekül aus zwei Untereinheiten. Das Lipid A, das aus sechs oder mehr, an zwei phosphorylierte Glucosamine gebundenen Fettsäuren besteht und den immunologisch relevanten Teil des LPS-Moleküls darstellt, und der Polysaccharidkette, die sich wiederum aus zwei Teilen zusammensetzt, nämlich aus einem Kernteil (*core*) und einer Oligosaccharidkette (O-Antigen). Der Kernteil ist spezifisch für ganze Gruppen von Bakterien, während das O-Antigen von Spezies zu Spezies und von Stamm zu Stamm stark variiert.

### 1.2.3.5 CpG ODN's

TLR9 wird durch spezifische unmethylierte CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin)-reiche Sequenzen in bakterieller DNA oder durch synthetische Oligonukleotide (ODN's) aktiviert. Diese spezifischen CpG-Sequenzen sind häufig in bakterieller DNA, aber sehr selten in Säugetier-DNA anzutreffen. Der Methylierungsgrad stellt ein wesentliches Unterscheidungskriterium zwischen bakterieller und Säugetier-DNA dar. Unmethylierte DNA mit eingeschlossenen CpG Sequenzen kann die Effekte von bakterieller DNA imitieren, wie z.B. die B-Zell Proliferation.

Es gibt 3 Typen von stimulatorischen CpG ODN's: A-, B- und C-Typ, die sich in ihren immunstimulatorischen Aktivitäten unterscheiden.



**Abb. 1.2.3.5.1: Hauptsächliche Angriffspunkte und deren Auswirkungen hervorgerufen durch die verschiedenen CpG ODN's.**

ODN	Sequenz (5' - 3')
2216 (A – Typ)	ggG GGA CGA TCG TCg ggg gg
2006 (B – Typ)	tcg tcg ttt tgt cgt ttt gtc gtt
2395 (C – Typ)	tcgtcgttttcggcgc:gcgccg

**Abb. 1.2.3.5.2: Die unterschiedlichen Basensequenzen der drei CpG ODN Klassen.** Basen in Großbuchstaben dargestellt bezeichnen Phosphodiester und Basen in Kleinbuchstaben sind Phosphorothioate (Nuklease resistent).

### 1.2.3.6 iODN's

Neben den synthetischen CpG ODN's, die stimulatorische Eigenschaften besitzen, existieren sogenannte inhibitorische ODN's, die mehr oder weniger spezifisch inhibitorisch auf verschiedene TLR's wirken.

iODN	Sequenz (5' - 3')
2088 (TLR7/8/9 inh.)	TCC TGG CGG GGA AGT
20958 (TLR7 inh.)	TCC TAA CAA AAA AAT
20959 (TLR7/8 inh.)	TAA TGG CGG GGA AGT

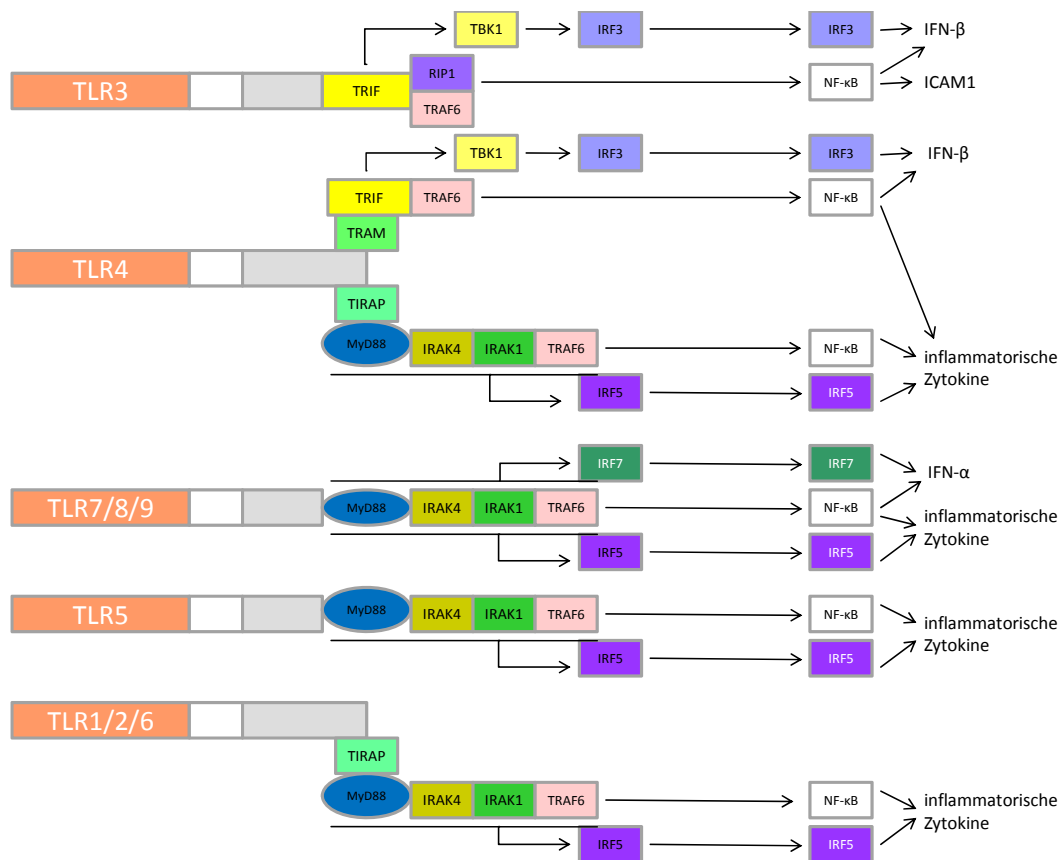
**Abb. 1.2.3.6.1: Die unterschiedlichen Basensequenzen der verwendeten iODN's.**

### 1.2.4 Die Signalkaskade der TLR's

Je nachdem welcher der zehn TLR's durch seinen Liganden angesprochen wird, unterscheiden sich die nachfolgenden unterschiedlichen Adapterproteine in der Signalkaskade. Es wird zwischen einem MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Weg unterschieden (8, 28).

Beim MyD88-abhängigen Weg löst die Assoziation der TLR's mit MyD88 - direkt oder indirekt über das Adapterprotein TIRAP - die Rekrutierung der Moleküle der IRAK-Familie aus. IRAK-1 wird hyperphosphoryliert und induziert die Interaktion mit TRAF6. Der Komplex aus MyD88, IRAK4, IRAK1 und TRAF6 führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie Interferon-aktivierenden Faktoren (IRF3, IRF5 und IRF7) und NF- $\kappa$ B. Dadurch kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine.

Beim MyD88-unabhängigen Weg wird anstelle des Adapterproteins MyD88 das Adapterprotein TRIF rekrutiert, beim TRIF-abhängigen TLR4-Signalweg wird zusätzlich das Adapterprotein TRAM benötigt. Die Aktivierung von TRIF führt zur Rekrutierung der Kinase TBK1, die wiederum IRF3 induziert. Die Assoziation von TRAF6 an das Adapterprotein TRIF - bei TLR3 in Verbindung mit RIP1 - führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Dabei kommt es zur Bildung von Typ I-IFN. Die Besonderheit des TLR3-Signalweges liegt außerdem in der Induktion zur Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM1, welches durch den TRIF-RIP1-TRAF6-Komplex induziert wird (Abb. 1.2.4.1) (6, 28-29).



**Abb. 1.2.4.1: Schematische Darstellung der TLR-Signalwege.** Es werden der MyD88-abhängige und der MyD88-unabhängige Signalweg unterschieden. Beide aktivieren die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B sowie verschiedene Interferon-regulierende Faktoren (IRF3, IRF5, IRF7) und induzieren so die Freisetzung verschiedener Zytokine, sowie die Bildung von Adhäsionsmolekülen. Die Abbildung ist modifiziert von (28).

### 1.3 Die dendritischen Zellen

Bei diesen Zellen handelt es sich um eine heterogene Zellpopulation, die ihren Namen den typischen zellulären Ausläufern zu verdanken haben.



**Abb. 1.3.1: Dendritische Zellen.**

Die dendritische Zelle (DC) wurde erstmals 1868 in der Epidermis beschrieben und nach ihrem Entdecker als Langerhans-Zelle benannt. Fast hundert Jahre später wurden DC's auch in anderen Geweben entdeckt und als wichtige Zellen des Immunsystems erkannt (30).

DC's sind professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) mit einer außergewöhnlichen Fähigkeit, primäre Immunantworten auszulösen. Außerdem nehmen DC's einen hohen Stellenwert in der Induktion der immunologischen Toleranz ein und sind verantwortlich für die Regulation der T-Zell-vermittelten Immunantworten.

DC's sind also eine besondere Form der APC's, die besonders in der Lage sind primäre Immunantworten und ein immunologisches Gedächtnis zu initiieren.

Stammzellen aus dem Knochenmark teilen sich zu zirkulierenden Vorläuferzellen, die in den verschiedenen Geweben als unreife DC's mit großer Phagozytoseaktivität sesshaft werden. Sie finden sich in den meisten peripheren Geweben, wie auch der Lunge und besonders an den Grenzschichten zur Außenwelt (Haut, Mucosa).

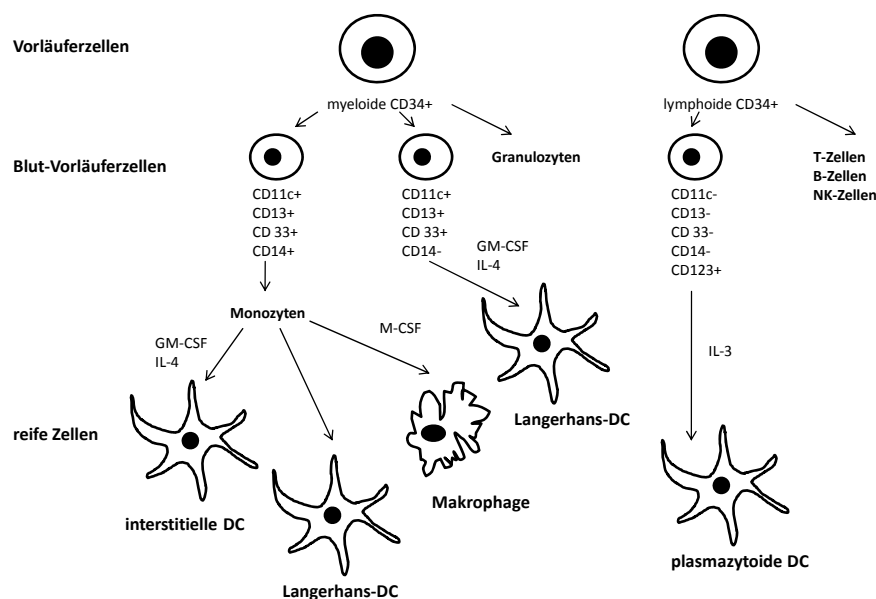
Erst nach Antigenaufnahme oder Stimulation durch das umliegende Zytokinmilieu des jeweiligen infizierten Gewebes oder Organs reifen sie aus und sind in der Lage T-Zellen zur



Aktivierung und Proliferation anzuregen, wobei eine einzige dendritische Zelle hunderte von naiven T-Zellen stimulieren kann. Nach der Migration zu den lymphatischen Organen präsentieren sie T-Zellen die prozessierten Antigene und lösen so eine Immunantwort aus.

### 1.3.1 DC-Subpopulationen

Es sind mindestens vier Entwicklungsstufen der DC's bekannt: a) Progenitor-DC's aus dem Knochenmark; b) Vorläufer-DC's, die sich im Blut, in der Lymphe und in den lymphatischen Geweben aufhalten und die, wenn sie Pathogene erkannt haben, hohe Mengen an Zytokinen freisetzen (z.B. IFN- $\alpha$ ); c) gewebsständige unreife DC's (iDC's), die eine große Phagozytoseaktivität aufweisen und d) reife DC's, die sich in den sekundären lymphatischen Organen befinden und große Mengen an kostimulatorischen Molekülen exprimieren (31-34). Mindestens zwei Subpopulationen der Vorläufer-DC's zirkulieren im Blut, nämlich die CD14<sup>+/+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD1c<sup>+</sup> Vorläuferzellen und die CD14<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup> Vorläuferzellen (35-38).



**Abb. 1.3.1.1: Verschiedene Ursprünge der dendritischen Zellen (DC's).** Die Abbildung ist modifiziert von (39).

Anhand der Lokalisation der DC's kann man u.a. epidermale Langerhans-DC's (LC's), dermale (intestinale) DC's, marginale Milz-DC's, germinale Zentren-DC's, Thymus-DC's, Leber-DC's, Lungen-DC's und Blut-DC's unterscheiden. Alle diese Zellen weisen einige phänotypische Unterschiede zueinander auf; ihre Herkunft, ihre Reifestadien und ihre funktionellen Unterschiede sind bis dato noch nicht komplett erforscht.

Zum anderen können DC's auch anhand ihrer verschiedenen Funktionen unterschieden werden. Einige regulieren die B-Zell-Proliferation, andere die Aktivierung naiver T-Zellen, wieder andere aktivieren NK-Zellen (CD11c<sup>-</sup>-Vorläuferzellen aktivieren NK-Zellen durch IFN- $\alpha$  Produktion und führen so zu einer gesteigerten antiviralen und antitumoralen Aktivität der NK-Zellen) (40-42). In späteren Stadien der Differenzierung regulieren DC's die Aktivität der NK-Zellen über IL-12<sup>-</sup>, IL-15<sup>-</sup> und IL-18-Produktion (43-44) und einige induzieren antigenspezifische Unempfindlichkeit auf Seiten der Lymphozyten in den primären und sekundären lymphatischen Organen über Deletion bzw. Induktion von regulatorischen Zellen (39).

CD14<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> -DC's lassen naive T-Zellen vornehmlich zu T<sub>H1</sub>-Zellen differenzieren, während CD11c<sup>-</sup> -DC's die T-Zellen dazu veranlassen das Zytokinprofil der T<sub>H2</sub>-Zellen zu sezernieren. Neben der Aktivierung naiver T-Zellen können DC's auch direkt naive und Gedächtnis-B-Zellen aktivieren. DC's unterstützen die Differenzierung aktivierter naiver B-Zellen zu Plasmazellen durch IL-12<sup>-</sup> und IL-6-Sekretion.

### 1.3.2 DC-Migration und -Reifung

DC's stammen von CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen aus dem Knochenmark oder von CD14<sup>+</sup> Monozyten ab. Die Progenitorzellen teilen sich zu Vorläufer-DC's. Daraus gehen unreife DC's (iDC's) und Langerhanszellen (LC's) hervor, die CCR6 (CC motif receptor 6) exprimieren. Der Ligand des CCR6 ist MIP-3 $\alpha$ , der als stärkstes Chemokin der DC-Migration bekannt ist (45-46). MIP-3 $\alpha$  hat keinen Effekt auf unreife MoDC's (45-47). MIP-3 $\alpha$  wird hauptsächlich von Epithelzellen exprimiert (wie z.B. in Tonsille oder Magen-Darm-Trakt) und dessen Expression

wird durch entzündliche Prozesse vermehrt ausgelöst. Nach Antigenkontakt der DC's wird die CCR6-Expression durch die Expression von CCR7 ersetzt, dessen Liganden 6CKine (CCL21) (wird von Lymphgefäßwänden exprimiert) und MIP-3 $\beta$  (CCL19) (wird in T- und B-Zellregionen exprimiert) sind. Dieser Rezeptor führt die reifenden DC's zu den T- und B-Zell-Regionen, wo sie dann mit der Produktion von Chemokinen und Zytokinen beginnen und so Lymphozyten anlocken.

Für die Stimulation naiver T-Zellen (sog. *priming*) ist die verstärkte Expression von Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen auf den reifen DC's wie z.B. CD80, CD86 und MHC-Klasse-II-Molekül notwendig.

Das *priming* geschieht in den T-Zell-Regionen der Lymphknoten, wohin die dendritischen Zellen nach ihrer Stimulation über das afferente Lymphsystem wandern. So wird das Muster der Expression von Chemokin-Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen verändert, um die Migration der reifen Zellen zu den lymphatischen Geweben zu ermöglichen (z.B. wird CCR7 ((CC motif receptor 7), der den Rezeptor für CCL19 und CCL21 darstellt) vermehrt exprimiert).

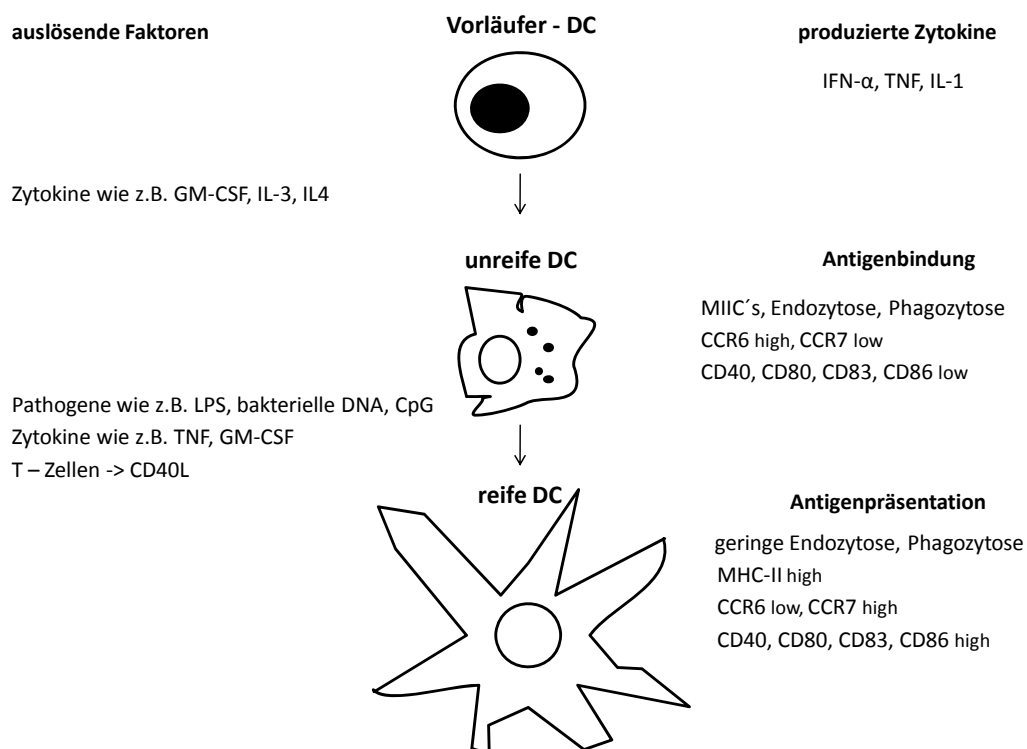
Außerdem sezernieren DC's weitere Zytokine und Chemokine (Moleküle, die z.B. für die Aktivierung und Migration von Leukozyten entlang eines chemischen Gradienten verantwortlich sind), welche die Zellen des angeborenen Immunsystems an den Ort der Entzündung locken und aktivieren.

### 1.3.3 Aufnahme von Antigenen

Unreife DC's sind sehr effizient in der Aufnahme von Antigenen. Dazu nutzen sie verschiedene Mechanismen wie Makropinozytose, Rezeptor-vermittelte Endozytose über den Mannose-Rezeptor (48-53) oder Fc $\gamma$ -Rezeptor I (CD64) und II (CD32) (für die Aufnahme von Immunkomplexen oder opsonierten Partikeln (54)) sowie die Phagozytose von Bakterien (55-56), Viren, intrazellulären Parasiten oder apoptotischen und nekrotischen Zellfragmenten (57-59).

### 1.3.4 DC-Aktivierung und -Reifung

Die DC-Reifung ist ein kontinuierlicher Prozess, der in der Peripherie durch die Aufnahme von Antigenen und/oder inflammatorischen Zytokinen ausgelöst wird, und ihren Abschluss z.B. in der DC-T-Zell-Interaktion findet. Zahlreiche Faktoren induzieren und/oder regulieren die DC-Reifung.



**Abb. 1.3.4.1: Reifung der dendritischen Zellen.** Die Abbildung ist modifiziert von (39).

Der Reifungsprozess beinhaltet mehrere Veränderungen, die z.B. Morphologieveränderungen, Veränderungen von Adhäsionsmolekülen, Reorganisation des Zytoskeletts und größere zelluläre Motilität beinhalten (60). Außerdem beobachtet man bei reifen DC's einen Verlust der Phagozytoserezeptoren und die Hochregulation von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen, die für die T-Zell-Aktivierung notwendig sind. Dazu gehören u.a.

CD80 und CD86, die zum sog. B7-Komplex gehören und mit CD28 auf den T-Zellen interagieren. Wichtig für die T-Zellstimulierung ist die Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen, über die die Erkennung durch den spezifischen T-Zellrezeptor verläuft. Deshalb exprimieren stimulierte und ausgereifte DC's vermehrt diese Moleküle auf ihren Oberflächen. Weitere Oberflächenmoleküle, die hochreguliert werden, sind das CD83, ein relativ spezifischer Marker für reife dendritische Zellen (61), CD1a, das strukturelle Ähnlichkeiten zu MHC-Proteinen hat mit ebenfalls antigenpräsentierender Funktion, und CD40, das mit dem CD40-Liganden auf T-Zellen interagiert. Reife dendritische Zellen exprimieren auch den Oberflächenmarker CD54 (ICAM I) (32).

### **1.3.5 Antigen-Aufarbeitung und -Präsentation**

#### **1.3.5.1 MHC-Klasse II**

Lösliche und kleine partikuläre Antigene werden von unreifen DC's entweder durch Phagozytose, Makropinozytose oder durch rezeptorvermittelte Endozytose effizient aufgenommen und in Endosomen zu intrazellulären MHC-II-Kompartimenten verbracht (39, 49, 52, 62-64). Unreife DC's akkumulieren MHC-Klasse-II-Moleküle in Lysosomen-ähnlichen intrazellulären Kompartimenten (sog. MIIC's = *MHC-II-rich-compartiments*) (65-66). Die MHC-Klasse-II-Moleküle der unreifen DC's werden schnell wieder ins Zellinnere aufgenommen und haben nur eine kurze Halbwertszeit. Reifungs- und Entzündungsstimulationen führen jedoch zu einer hochgradig gesteigerten MHC-Klasse-II-Synthese und Translokation der MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe auf die Zelloberfläche, wo sie für mehrere Tage verbleiben und von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden können (42, 60, 64, 67).

### 1.3.5.2 MHC-Klasse I

Um  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen zu aktivieren müssen DC's die Peptide auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren.

Die phagozytierten Partikel oder Immunkomplexe werden im Zytosol gespalten und dann in Proteasomen zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. Auch das Zusammensetzen des MHC-I-Moleküls findet im ER statt. Die Peptide lagern sich an das MHC-I-Molekül an und wenn die Verbindung stabil genug ist wird der neu entstandene MHC-I-Peptid-Komplex in Vesikeln des ER zur Zelloberfläche transportiert (68).

### 1.3.6 T-Zell-Aktivierung

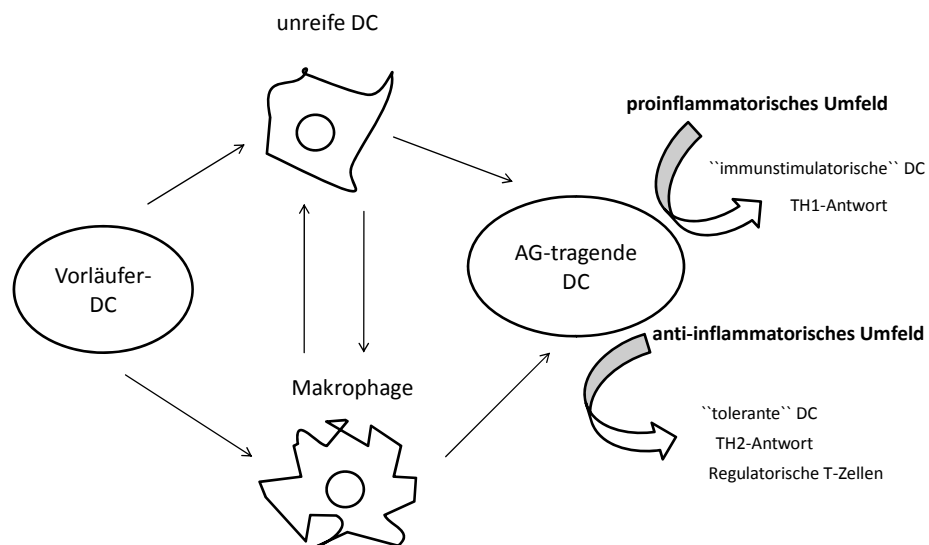
Die wichtige Funktion der DC's ist die Stimulation von naiven  $CD4^+$  T-Zellen *in vitro* und *in vivo*.

In Gegenwart freier Antigene können von DC's aktivierte  $T_H$ -Zellen mit B-Zellen interagieren und so eine antigenspezifische Antikörperproduktion stimulieren (69).

DC's stimulieren auch naive  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen (CTL) und somit ihre Proliferation (70). Desweiteren können DC's direkt antigenspezifische CTL von Vorläuferzellen generieren (71-73).

MHC-Moleküle und MHC-Peptid-Komplexe kommen auf DC's in 10 - 100 fach größerer Menge vor als auf anderen APC's (wie z.B. B-Zellen oder Monozyten).

### 1.3.7 Plastizität der dendritischen Zellen



**Abb. 1.3.7.1: Die Plastizität der dendritischen Zellen.** Die Abbildung ist modifiziert von (39).

Die Funktionen der DC's können sich ändern. So können sich DC's z.B. nach einer Stimulation mit M-CSF zu Makrophagen mit großer Phagozytoseaktivität differenzieren. Außerdem können IL-12 sezernierende DC's, die so die  $T_{H1}$ -Zelldifferenzierung induzieren, durch IL-10- und  $PGE_2$ -Stimulation eine T-Zell-Anergie oder eine T-Zell-Differenzierung in Richtung  $T_{H2}$ -Zellen oder regulatorischen T-Zellen auslösen.

## 1.4 T-Zellen

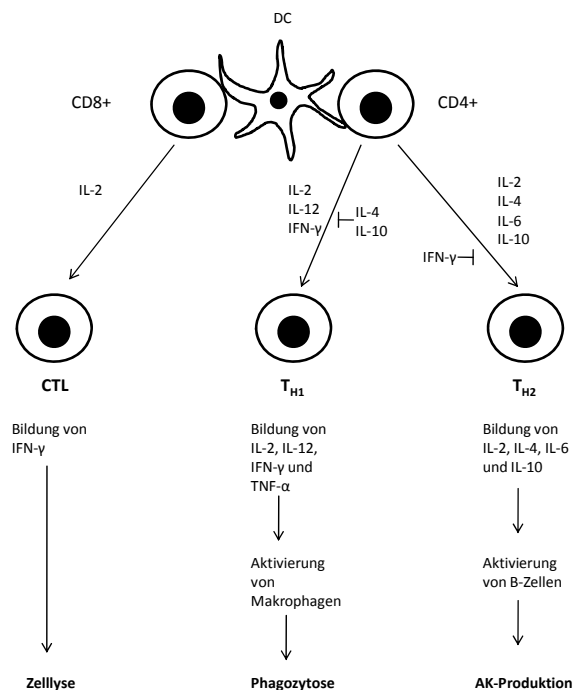
Die T-Lymphozyten stammen wie alle Blutzellen aus dem Knochenmark. Nach der Wanderung der T-Zellen zum Thymus reifen sie dort aus. Es werden MHC-Moleküle auf ihrer

Oberfläche ausgebildet und die Zellen selektiert, die die körperfremden Antigene mit hoher Affinität erkennen (74).

Die T-Zellen erkennen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) körperfremde Antigene jedoch nur, wenn sie auf der Oberfläche von APC's an deren MHC gebunden sind.

### 1.4.1 T-Zell-Subpopulationen

Es existieren  $CD4^+$  T-Zellen, die, wegen ihrer wichtigen Funktion bei der T-B-Stimulation, auch T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen) genannt werden. Sie produzieren selbst oder induzieren die Produktion von Interleukinen, dadurch aktivieren sie unter anderem Makrophagen und haben regulierende Wirkung auf andere Lymphozyten.



**Abb. 1.4.1.1: T-Zell-Differenzierung.**



Außerdem kommen  $CD8^+$  T-Zellen vor, die auch oft als zytotoxische T-Zellen (CTL) bezeichnet werden, da sie virusinfizierte, histoinkompatible oder sonst veränderte Zellen zerstören können. Sie haben aber auch viele über Interleukinfreisetzung und -induktion vermittelte nichtlytische Funktionen.

Als dritte bekannte Gruppe der T-Zellen sind die  $\gamma\delta$ -T-Zellen zu nennen.

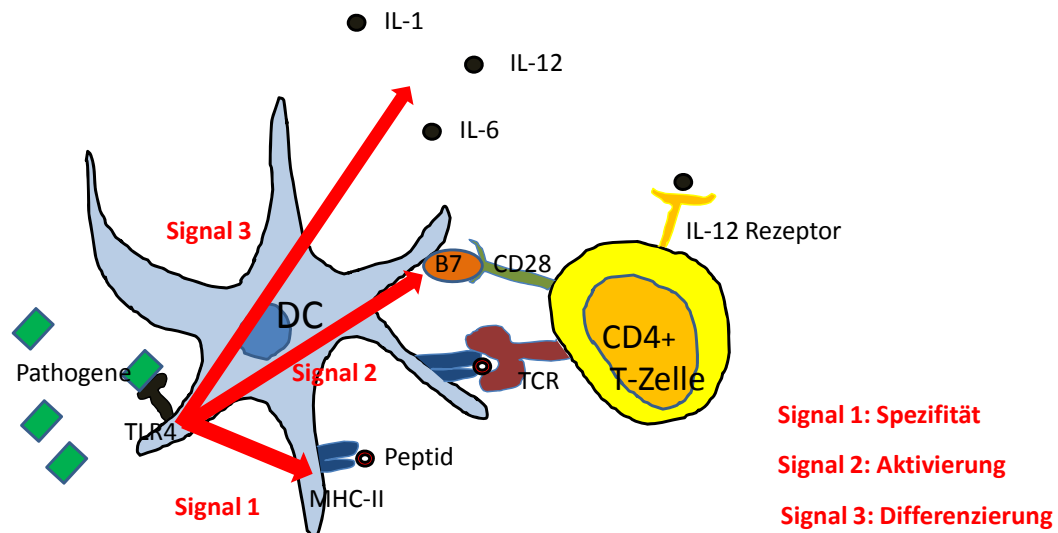
### 1.4.2 T-Zell-Aktivierung

T-Zellen werden erst durch APC's aktiviert (75). Bei Virusinfektionen spielt vor allem die dendritische Zelle als professionelle APC neben B-Zellen und Makrophagen die Hauptrolle.

Die Interaktion zwischen  $CD8^+$  CTL und ihren Zielzellen erfolgt über MHC-Klasse-I-Moleküle.

Die Interaktion zwischen APC's und  $CD4^+$  T-Zellen erfolgt über MHC-Klasse-II-Moleküle. Dazu migrieren die reifen DC's in die paracortikale Zone der Lymphknoten und präsentieren den  $CD4^+$  T-Zellen die prozessierten Antigene. Die naiven T-Zellen, deren TCR spezifisch an die von der reifen DC präsentierten MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe bindet, werden determiniert. Dieses erste Signal allein genügt aber noch nicht, um eine ausreichende Aktivierung und klonale Expansion der T-Zellen auszulösen. Es bedarf eines zweiten Signals über kostimulatorische Moleküle wie z.B. CD80/86 (B7-Komplex), die mit dem CD28-Molekül der T-Zellen interagieren. CD86 wird als wichtigstes Molekül für die Auslösung von T-Zell-Antworten angesehen (76-77). Als drittes Signal dient das von reifen DC's freigesetzte Zytokinprofil, das die funktionelle Ausrichtung der  $CD4^+$  T-Zellen bestimmt und die Ausbildung einer  $T_{H1}$ -bzw.  $T_{H2}$ -dominierten Immunantwort steuern kann.

T-Zellen können DC's über CD40-L-CD40 aktivieren, was auf Seiten der DC's zu einer erhöhten Expression von CD80/86 und Zytokinproduktion (IL-1, TNF, IL-12, Chemokine) führt (62, 78-81). Außerdem können aktivierte T-Zellen die Sekretion von IL-12, IL-6 und IL-1 bei DC's stimulieren, was zu einer erhöhten DC-Überlebenszeit, einer Inhibition der DC-Apoptose und somit zu einer erhöhten T-Zell-Proliferation führt.



**Abb. 1.4.2.1: T-Zell-Aktivierung durch reife DC's.**

Biochemisch findet die erste Signalweiterleitung über den TCR-assoziierten CD3-Komplex statt, indem eine Tyrosinkinase aktiviert wird, die ihrerseits die Phospholipase C (PLC) aktiviert. PLC spaltet dann Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> setzt Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern frei, DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Die PKC wie auch Ca<sup>2+</sup> induzieren und aktivieren Phosphoproteine, die im Zellkern für die IL-2 Gentranskription notwendig sind. Durch die CD28-Stimulation werden Tyrosinkinasen aktiviert, die sowohl die Transkription unterstützen, sowie die mRNA für die IL-2-Produktion posttranskriptionell stabilisieren (74).

## 1.5 Verschiedene Marker-Moleküle

### 1.5.1 HLA-DR

Das Oberflächenmolekül HLA-DR, das humane MHC-Klasse-II-Molekül, stellt ein Transmembran-Glykoprotein, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, dar. Es kommt primär auf allen antigenpräsentierenden Zellen vor, wie z. B. Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und aktivierten T-Zellen. Anhand dieses Moleküls kann man den Reifungsstatus der Zelle erkennen (82).

### 1.5.2 CD40, CD83, CD86

Diese Oberflächenmoleküle stellen Reifungsmarker dar. CD40 befindet sich vor allem auf B-Zellen, die im peripheren Blut und in den Tonsillen vorkommen, aber es wird nicht auf letztendlich differenzierten B-Zellen exprimiert. Außerdem kommt es auf einigen DC's und Makrophagen vor. CD40 dient als Rezeptor für den CD40-Liganden und fördert so das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen und die Zytokinproduktion bei Makrophagen und dendritischen Zellen. CD83 wird von DC's und einigen B-Zellen exprimiert und dient als Aktivierungsmarker für DC's. CD86 findet man primär auf der Oberfläche von Monozyten, aktivierten APC's, insbesondere auf DC's (83-84).

### 1.5.3 BDCA-2, BDCA-4, BDCA-1

BDCA-2 (CD303) ist auf der Oberfläche von frisch isolierten plasmazytoiden DC's (pDC's) zu finden und ist auch an der Antigenbindung und-prozessierung beteiligt.

Neben pDC's exprimieren auch *in vitro* generierte MoDC's und hämatopoetische Stammzellen BDCA-4 (CD304/Neuropilin-1).

Das Oberflächenmolekül BDCA-1 (CD1c) gehört zu der CD1 Familie, deren Proteine strukturell verwandt sind mit denen der MHC-Klasse-I. BDCA-1 findet sich hauptsächlich auf myeloiden dendritischen Zellen (mDC's), *in vitro* generierten MoDC's, kortikalen Thymozyten, Langhans Zellen und hämatopoetischen Stammzellen. Es ähnelt, wie auch CD1a, dem MHC-Klasse-I-Molekül und dient der nicht-Peptid-Antigen-Präsentation und der Lymphozyten-Aktivierung und Entwicklung (85-86).

#### 1.5.4 CD25

CD25 ist auch als die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors bekannt. Sie wird auf aktivierten T- und B-Zellen, Makrophagen, aktivierten Monozyten und einem Teil der regulatorischen T-Zellen sowie auf einigen regulatorischen DC's exprimiert (87).

#### 1.5.5 CD123

CD123 ist die  $\alpha$ -Kette des IL-3-Rezeptors und wird in hohem Maße nur auf pDC's und basophilen Granulozyten exprimiert. Auf myeloiden Stammzellen, Mastzellen, Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, mDC's, eosinophilen Granulozyten findet man sie nur in geringen Konzentrationen (88).

### 1.5.6 CD122

CD122 stellt die  $\beta$ -Kette des IL-2-Rezeptors dar und wird vor allem von reifen T- und prä-B-Zellen, Thymozyten, Monozyten und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Es ist an der IL-2- und IL-15-vermittelten Signalübertragung beteiligt (83).

### 1.5.7 FOXP3

FOXP3 (*Forkhead box protein P3*) ist ein Transkriptionsfaktor, der ein regulatorisches Schlüssel-Gen bei den regulatorischen T-Zellen darstellt und somit ein spezifischerer Marker für diese Zellen ist als die Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 (89).

## 1.6 Verschiedene inflammatorische und antiinflammatorische Zytokine

### 1.6.1 IL-1 $\beta$

Interleukin-1 $\beta$  gehört zu der IL-1 Familie. Es wird hauptsächlich von Makrophagen und zum Teil auch von Epithelzellen produziert. IL-1 $\beta$  ist ein hochwirksames Zytokin. Es führt schon in geringen Konzentrationen zu Fieber, einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten, der Akute-Phase-Proteine und IL-6. Außerdem unterstützt es die Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen (90).

IL-1 $\beta$  induziert über den aktivierten IL-1-Rezeptor Typ 1 (vorhanden in Endothelzellen) über NF- $\kappa$ B die Transduktion der Cyclooxygenase 2 (COX2) und führt darüber zu einer vermehrten Bildung von PGE<sub>2</sub> (91).

So führt IL-1 $\beta$  zu einer vermehrten Bildung von CD14, einer vermehrten IL-6-Freisetzung und einer vermehrten Freisetzung an neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark (91, 68).

### 1.6.2 IL-6

Auch Interleukin-6 reguliert verschiedene Entzündungsreaktionen im Organismus und ist in der Abfolge der Entzündungskaskade u.a. TNF- $\alpha$  untergeordnet.

Es regelt komplex die Funktionen anderer Zellen und Zytokine. Somit nimmt es eine Schlüsselstellung im Übergang der Mechanismen des angeborenen Immunsystems zu den Mechanismen des erworbenen Immunsystems ein (92).

IL-6 wird vor allem von T-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen produziert und induziert das Wachstum und die Differenzierung von T- und B-Zellen. Außerdem löst es Fieber und die Transkription von Akute-Phase-Proteinen aus. Es ist involviert in der Regulation der Apoptose von Leukozyten und in seiner Anwesenheit differenzieren sich Monozyten vermehrt zu Makrophagen.

Durch die Aktivierung des IL-6-Rezeptors wird im Zellinneren eine Janus-aktivierte Kinase (JAK) an einem Tyrosin phosphoryliert, wodurch der JAK-STAT-Signalweg und der MAP-Kinase-Weg aktiviert werden, welcher dann zu der Transkription verschiedener Zielgene im Zellkern führt (93-94).

Bei einer akuten lokalen Entzündung werden zunächst neutrophile Granulozyten rekrutiert, die den Entzündungsherd infiltrieren, dann aber rasch absterben und durch Lymphozyten und mononukleäre Zellen ersetzt werden. Mit dem Grad der Infiltration der neutrophilen Granulozyten steigt die Konzentration des löslichen IL-6-Rezeptors (sIL-6R), was auf verschiedenen Wegen zu einer Begrenzung der neutrophilen Granulozyten im entzündeten Gewebe führt. Dadurch werden gleichzeitig CD3<sup>+</sup> T-Zellen angelockt, was den Übergang von der angeborenen Immunantwort zu der erworbenen Immunantwort markiert (92, 68).

### 1.6.3 IL-8

Interleukin-8 wird vor allem von Makrophagen, Epithelzellen und Endothelzellen produziert. Es stellt einen der Hauptvermittler der Entzündungsreaktionen dar. Neben der Funktion eines Lockstoffes ist es ein potenter Angiogenese-Faktor (95).

Die Hauptfunktion des IL-8 ist die Induktion von Chemotaxis bei seinen Zielzellen (neutrophile Granulozyten) und deren Aktivierung zur Phagozytose.

Auch nachdem Makrophagen Antigene phagozytiert haben, sezernieren sie IL-8 und locken so andere Immunzellen an den Ort der Entzündung (68).

### 1.6.4 IL-10

Interleukin-10 stellt ein antiinflammatorisches Zytokin dar, welches zahlreiche Funktionen in der Regulation des Immunsystems ausübt. Es wird hauptsächlich von Makrophagen und T-Zell-Subpopulationen produziert.

Es wirkt u.a. hemmend auf Abwehrvorgänge und schützt so den Organismus vor einer übersteigerten Entzündungsreaktion (96). Desweiteren hemmt es die Bildung von Zytokinen der  $T_{H1}$ -Antwort (IL-2, IL-3, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ ) und wirkt verlängernd auf das Überleben, die Vermehrung und die Antikörperproduktion von B-Zellen. IL-10 blockiert außerdem NF- $\kappa$ B und ist in die Regulation des JAK-STAT-Signalweges miteinbezogen.

So hemmt es die Bildung von TNF und IL-6 in antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten und DC's und damit direkt die Aktivierung von T-Zellen. Außerdem lenkt es die  $CD4^+$  T-Zellantwort mehr von der  $T_{H1}$ - auf  $T_{H2}$ -Differenzierung und es fördert die Proliferation von B-Zellen und ihre Differenzierung zu Plasmazellen. Desweiteren blockiert es die Translokation von MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexen auf die Zelloberfläche und somit auch die DC-Reifung (68).

### 1.6.5 IL-12p70

IL-12 besteht aus den Untereinheiten IL-12p35 und IL-12p40. Die biologisch aktive Form des IL-12 wird IL-12p70 bezeichnet.

IL-12 wird von DC's, Makrophagen und B-Zellen produziert. Es ist bei der Differenzierung von naiven  $CD4^+$  T-Zellen zu  $T_{H1}$ -Zellen behilflich. Weiterhin stimuliert IL-12p70 das Wachstum und die Funktion der T-Zellen. So induziert es bei T-Zellen und NK-Zellen die Produktion von IFN- $\alpha$  und TNF- $\alpha$ .

IL-12p70 vermittelt die Steigerung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen und  $CD8^+$  CTL (97). Des Weiteren übt es indirekt eine anti-angiogenetische Funktion aus, die über eine Induktion von IFN- $\gamma$  führt (68).

### 1.6.6 TNF

Tumornekrosefaktor (TNF) stellt ein multifaktorielles Zytokin des Immunsystems dar, welches an Entzündungsreaktionen beteiligt ist.

TNF- $\alpha$  wird hauptsächlich von Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen produziert und ist für die Entstehung einer Entzündungsreaktion und Endothelaktivierung verantwortlich.

TNF- $\beta$  wird hauptsächlich von T- und B-Zellen produziert und regelt vor allem Apoptose und Endothelaktivierung.

Beide sind also für die Regulation der Aktivität der verschiedenen Immunzellen, wie z.B. die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zytokinproduktion, unerlässlich (98, 68).



## 1.7 Zielsetzung

Seit 1959 Schwartz et al. (99-100) belegten, dass 6-Mercaptopurin effektiv die Lymphozytenproliferation hemmt und somit eine längere Transplantat-Halbwertszeit erreicht werden konnte, wurden immunsuppressive Medikamente in der experimentellen und klinischen Therapie verstärkt angewendet.

Zu dieser Zeit konzentrierte man sich auf die Beeinflussung der Lymphozytenproliferation, als Hauptangriffspunkt, zur Veränderung der Immunantwort.

Deshalb waren viele traditionelle immunsuppressive Medikamente solche, von denen man glaubte, dass sie als Hauptwirkungsmechanismus in die Lymphozytenproliferation eingreifen.

Es gibt heute aber viele Beweise dafür, dass viele lang etablierte immunsuppressive Medikamente schon in früheren Stufen der Immunantwort eingreifen, nämlich bei der Aktivierung der DC's.

DC's sind eine heterogene Zellpopulation von APC's, die Immunantworten auslösen und regulieren (39). So lösen sie Immunantworten entweder über das angeborene Immunsystem aus, indem sie NK-Zellen aktivieren. Oder sie vermitteln Immunantworten über das erworbene Immunsystem, indem sie naive T- und B-Zellen aktivieren. Außerdem können DC's die Bildung von regulatorischen T-Zellen induzieren (39). So existieren einige Immunsuppressiva, wie Rapamycin (101-103) oder Acetylsalicylsäure (104-105), die in der klinischen Therapie bereits eingesetzt werden und auch Schlüsselfunktionen der DC's beeinflussen (106-107).

Imidazoquinoline gehören zu den wenigen klinisch verfügbaren immunstimulatorischen Medikamenten, die verschiedene Zellen des angeborenen Immunsystems entweder über *Toll-like* Rezeptor 7 (TLR7) oder über TLR7/8 aktivieren (108-109).

Der synthetische Imidazoquinolin-Bestandteil Resiquimod (R848), der seine Zielzellen über TLR7 und TLR8 moduliert, befindet sich zur Zeit in klinischen Studien über seine Wirkung bei aktinischer Keratose (110-111).

Von einigen Autoren wird eine durch R848 ausgelöste Beeinträchtigung der Differenzierung und Reifung der aus Monozyten generierten DC's (MoDC's) beschrieben (112). Andere Untersuchungen belegen, dass eine TLR7 und/oder 8 Stimulation der DC's immunstimulatorische Auswirkungen hat und verschiedene Signalwege der DC-Reifung in Gang setzt (113-115).

#### Zielsetzung:

Um die Wirkung des R848 auf *in vitro* generierte humane MoDC's besser zu verstehen, müssen systematische Untersuchungen des TLR7/8 Liganden R848 auf die MoDC-Differenzierung und -Reifung vorgenommen werden. Außerdem soll die funktionelle Rolle von R848 auf TLR7 und 8 analysiert werden und weitergehend die Auswirkung der mit R848 stimulierten MoDC's auf die allogene T-Zell Stimulation untersucht werden.

So können Rückschlüsse auf eine durch R848 ausgelöste Modulation der Immunantwort gezogen werden, um den Wirkstoff in Zukunft effektiv in der klinischen Therapie einsetzen zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

AutoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Automatischer Hämatologie-Analysator KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, D
Systec® 2540 EL Autoklav	Systec GmbH, Wetztenberg, D
Durchflusszytometer FACSCalibur™	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Durchflusszytometer FACSCanto II™	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Handdispenser <i>Handy Step</i> ®	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, D
Inkubator HERAccl240	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, D
Inolab pH-Meter	Inolab WTW, Weilheim, D
Laborzentrifuge Heraeus Biofuge primo	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, D
Laborzentrifuge ROTANTA/TRC	Hettich, Tuttlingen, D
Laborzentrifuge ROTIXA/A	Hettich, Tuttlingen, D
Laborzentrifuge ROTIXA/AP	Hettich, Tuttlingen, D
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Millipore™ Elix5 aqua dest Anlage	Millipore GmbH, Eschborn, D
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, D
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, D
Pipette <i>Research</i> , 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipette <i>Research</i> , 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg, D

Pipette <i>Research</i> , 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Plattenzentrifuge Heraeus Christ Labofuge <sup>GL</sup>	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, D
Rotationsschüttler CAT RM5	Kobe, Marburg, D
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, D
STARLAB <sup>®</sup> Pipettor	STARLAB GmbH, Ahrensburg, D
Waage Mettler <sup>®</sup> AE 100S	Mettler Toledo GmbH, Gießen, D
Waage Mettler <sup>®</sup> PJ 6000	Mettler Toledo GmbH, Gießen, D
Wasserbad Julabo <sup>®</sup> ED-5M	Julabo, Seelbach, D

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

24 well cell culture plate, flat bottom with lid, Cellstar <sup>®</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
96 well cell culture plate, flat bottom with lid, Cellstar <sup>®</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
96 well cell culture plate, U-bottom with lid, Cellstar <sup>®</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Blue MAX <sup>™</sup> Polypropylene Conical Tube, 50 ml	Becton Dickinson Labware, Heidelberg, D
Blue MAX <sup>™</sup> Polypropylene Conical Tube, 15 ml	Becton Dickinson Labware, Heidelberg, D
Corning <sup>®</sup> Cell Culture Dish, 60 x 15 mm style	Corning Incorporated, NY, USA
Dispenser-Tips, MTB, 1,25 ml, 2,5 ml, 5 ml	MTB, Gießen, D
Disposable Scalpel, Feather <sup>®</sup>	PFM, Köln, D
Einmalspritzen, 5 ml, 10 ml, 20 ml, Inject <sup>®</sup>	B. Braun, Melsungen, D
Filterspitze PP natur 0,5–10 µl	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, D

Filterspitze PP natur 1–100 µl	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, D
Filterspitze PP natur 100–1000 µl	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, D
BD Microlance™ 20G 1½, 0,9 x 40 mm	Becton Dickinson Labware, Heidelberg, D
Maxisorp, Nunc-Immuno Platte	Nunc, Roskilde, DK
Plastibrand® Präzisions Dispenser-Tips 12,5 ml	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, D
Sarstedt® Röhrchen, 5 ml, 75 x 12 mm, PS für <i>Flow Cytometry</i>	Sarstedt, Nümbrecht, D
<i>Transwell</i> ® 5 µm Polycarbonat	Corning Costar, NY, USA

### 2.1.3 Chemikalien

Aqua ad iniectabilia	Baxter S.A., Lessines, B
Aqua B. Braun, Ecotainer®	Braun, Melsungen, D
<i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	SERVA, Heidelberg, D
<i>Cellfix</i> ™ (10x)	BD Biosciences, Erembodegem, B
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, D
Dulbecco's PBS (DPBS 10x) ohne Ca <sup>2+</sup> & Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Ethanol 70%	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, D
Ethanol absolut puriss. p.a., steril	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Titriplex)	Merck, Darmstadt, D
FACS <i>Clean</i> ™	BD Biosciences, Heidelberg, D
FACS <i>Flow</i> ™	BD Biosciences, Heidelberg, D
FACS <i>Rinse</i> ™	BD Biosciences, Heidelberg, D

Ficoll-Paque™ PLUS	Amersham Biosciences, Uppsala, S
FOXP3 Fix/Perm Buffer (4x)	BioLegend, San Diego, USA
FOXP3 Perm Buffer (10x)	BioLegend, San Diego, USA
HEPES	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Hitze-inaktiviertes <i>Fetal Calf Serum Gold</i> (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Natriumazid	Merck, Darmstadt, D
Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS 1x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
RPMI 1640 mit Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A

#### 2.1.4 Fertige Reagenziensätze

<i>Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control (FBS) Compensation Particles Set</i>	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
<i>Anti-Rat and Anti-Hamster Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set</i>	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
BD™ Cytometric Bead Array (CBA), <i>Human Inflammatory Cytokines Kit</i>	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
CD14 <sup>+</sup> MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit	Molecular Probes, Eugene, USA

### 2.1.5 Immunmodulatoren

Resiquimod (R848)	InvivoGen, San Diego, USA
Gardiquimod	InvivoGen, San Diego, USA
Loxoribine	AXXORA, Lörrach, D
iODN 2088	AXXORA, Lörrach, D
iODN 20958	zur Verfügung gestellt von Dr. J. Vollmer, Coley Pharmaceutical GmbH, Düsseldorf, D
iODN 20959	zur Verfügung gestellt von Dr. J. Vollmer, Coley Pharmaceutical GmbH, Düsseldorf, D
CpG 2006	InvivoGen, San Diego, USA
Lipopolysaccharid (LPS O:6 B:26)	Sigma - Aldrich, Saint Louis, USA

### 2.1.6 Zytokine

rh GM-CSF	Promocell GmbH, Heidelberg, D
rh Interleukin-4	Strathmann Biotec GmbH Co. KG, Hamburg, D

### 2.1.7 Antikörper

AlexaFluor®647 anti-human FOXP3 <i>mouse</i>	BioLegend, San Diego, USA
IgG1 κ, Klon: 259D	

AlexaFluor®647 <i>mouse IgG1 κ Isotype Control</i> , Klon: MOPC-21	BioLegend, San Diego, USA
APC anti-human CD1a <i>mouse IgG1 κ</i> , Klon: HI149	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
APC anti-human CD11b/Mac-1 <i>mouse IgG1 κ</i> , Klon: ICRF44	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
APC anti-human CD25 <i>mouse IgG1 κ</i> , Klon: M-A251	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
APC <i>mouse IgG1 κ Isotype Control</i> , Klon: MOPC-21	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
APC-H7 anti-human CD4 <i>mouse IgG1 κ</i> , Klon: RPA-T8	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
APC-H7 <i>mouse IgG1 κ Isotype Control</i>	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
FITC anti-human CD14 <i>mouse IgG2 κ</i> , Klon: M5E2	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
FITC anti-human CD123 <i>mouse IgG2a</i> , Klon: AC145	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
FITC <i>mouse IgG2a κ Isotype Control</i> , Klon: G155-178	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
FITC <i>mouse IgG2a Isotype Control</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Pacific Blue™ anti-human CD3 <i>mouse IgG1 κ</i> , Klon: UCHT1	BioLegend, San Diego, USA
Pacific Blue™ <i>mouse IgG1 κ Isotype Control</i> , Klon: MOPC-21	BioLegend, San Diego, USA
PE anti-human BDCA-1 (CD1c) <i>mouse IgG2a</i> , Klon: AD5-8E7	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
PE anti-human BDCA-2 (CD303) <i>mouse IgG1</i> , Klon: AC144	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
PE anti-human BDCA-4 (CD304) <i>mouse IgG1</i> , Klon: ADS-17F6	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
PE anti-human CD25 <i>mouse IgG2b</i> , Klon: 4E3	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D



PE anti-human CD40 <i>mouse</i> IgG1 $\kappa$ , Klon: 5C3	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE anti-human CD83 <i>mouse</i> IgG1 $\kappa$ , Klon: HB15e	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE anti-human CD86 <i>mouse</i> IgG2b $\kappa$ , Klon: IT2.2	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE anti-human CD122 <i>mouse</i> IgG1 $\kappa$ , Klon: Mik- $\beta$ 3	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE anti-human CD123 <i>mouse</i> IgG1 $\kappa$ , Klon: 9F5	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE anti-human HLA-DR <i>mouse</i> IgG2a $\kappa$ , Klon: G46-6	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE <i>mouse</i> IgG1 <i>Isotype Control</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
PE <i>mouse</i> IgG1 $\kappa$ <i>Isotype Control</i> , Klon: MOPC-21	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE <i>mouse</i> IgG2a <i>Isotype Control</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
PE <i>mouse</i> IgG2a $\kappa$ <i>Isotype Control</i> , Klon: G155-178	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE <i>mouse</i> IgG2b $\kappa$ <i>Isotype Control</i> , Klon: 27-35	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
PE <i>mouse</i> IgG2b <i>Isotype Control</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

### 2.1.8 Computersoftware

CellQuest™, Version 3.2.1f1	Becton Dickinson, Heidelberg, D
DIVA6.1™	Becton Dickinson, Heidelberg, D
FCAP Array™ V 1.0.1	Becton Dickinson, Heidelberg, D

SPSS® Software Version 16.0

SPSS Inc., Chicago, USA

WinMDI, Version 2.8

Joe Trotter, Scribbs Research Institute, La  
Jolla, USA

### **2.1.9 Humanes Probenmaterial**

Die Isolation humaner Monozyten und PBMC's erfolgte aus Restmaterialien (*buffy coats*) gesunder Blutspender des Zentrums für Transfusionsmedizin und Hämotherapie, des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, am Standort Gießen. Alle Blutspender stimmten einer Verwendung überschüssigen Materiales ihrer Blutspende zu wissenschaftlichen Zwecken zu.

### **2.1.10 Statistik**

Für die statistischen Analysen der Daten wurde der *two-tailed t-test* und der *friedman test* verwendet. Eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant erachtet.

Alle Analysen wurden mit Hilfe der SPSS® Software Version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) erhoben.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC's) aus dem *buffy coat*

Unter einem *buffy coat* versteht man die Grenzschicht zwischen Erythrozyten und dem Blutplasma, die entsteht, wenn man Vollblut mit einem Gerinnungshemmer versetzt und dieses dann anschließend zentrifugiert. Die Schicht besteht hauptsächlich aus Leukozyten und Thrombozyten, aber zu einem kleinen Teil befinden sich auch Erythrozyten darin.

Die peripheren mononukleären Zellen (PBMC's) wurden aus frischen *buffy coats* aus dem Vollblut gesunder Blutspender des Zentrums für Transfusionsmedizin und Hämotherapie, des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, am Standort Gießen isoliert. Die Gewinnung der PBMC's erfolgte anhand der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.

Ficoll ist ein wasserlösliches, synthetisches Polymer aus Sucrose und Epichlorhydrin mit einer Dichte von 1,007 g/ml. Während der Zentrifugation sedimentieren die Blutzellen in Richtung der Grenzschicht zwischen Blut und Ficoll. Erythrozyten aggregieren durch das Reagenz und sedimentieren somit schnell zum Boden des Röhrchens. Auch tote Zellen höherer Dichte und Granulozyten passieren die Ficollphase. Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten haben eine geringere Dichte und können die Ficollschicht nicht penetrieren, sie sammeln sich in der Interphase an.

Das unter sterilen Bedingungen entnommene Blut aus einem *buffy coat* (Volumen ca. 80 ml) wurde gleichmäßig auf drei sterile 50 ml-Gefäße aufgeteilt und mit jeweils 30 ml Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) gemischt. Anschließend wurden 15 ml Ficoll-Paque™ PLUS in vier sterile 50 ml-Gefäße vorgelegt und vorsichtig mit dem Blut/PBS-Gemisch bis auf ein Gesamtvolumen von 50 ml geschichtet. Danach erfolgte eine Zentrifugation von 30 min bei 300 x g bei RT ohne Bremse. Der Interphasenring wurde mit

einer Pasteurpipette abgenommen und in zwei 50 ml-Gefäße überführt und jeweils mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach einer Zentrifugationsdauer von 10 min bei 340 x g wurde der Inhalt dekantiert. Das Zellpellet wurde aufgerüttelt und in 50 ml PBS aufgenommen. Es schloss sich eine Zentrifugation von 10 min bei 210 x g an. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Die Zellpellets wurden vereinigt und in 5 ml eiskaltem PBS/EDTA/BSA-Puffer aufgenommen und auf Eis gestellt. Für die Zellzahlbestimmung am Automatischen Hämatologie-Analysator KX-21N wurde ein Aliquot aus der Zellsuspension entnommen und 1:10 mit PBS verdünnt.

PBS/EDTA/BSA-Puffer	PBS (1x)
	2 mM EDTA
	0,5 % (w/v) BSA
	0,22 µm filtriert

### 2.2.2 Separation von CD14<sup>+</sup>-Zellen mit Hilfe des *automated magnetic activating cell sorting* (AutoMACS®)

Durch die magnetische Zellseparation (engl.: *magnetic activating cell sorting*, MACS®) können Zellen aus komplexen Zellgemischen mit hoher Reinheit für weitere Untersuchungen isoliert werden. Bei diesem System werden mit superparamagnetischen Mikropartikeln (ca. 50 nm Durchmesser) konjugierte Antikörper (*MicroBeads*) verwendet. Die gewünschten Zellen werden durch spezifische Antikörperbindung an *MicroBeads* markiert und durch eine Trennsäule, die aus Eisenkügelchen besteht, geführt. Die Trennsäule befindet sich zwischen Magnetpolen eines Hochleistungsmagneten. Durch das Anlegen eines elektromagnetischen Feldes werden die markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen die Säule passieren können (negative Fraktion). Die markierten Zellen lassen sich durch Ausspülen der Säule außerhalb des Magnetfeldes gewinnen (positive Fraktion). Das

MACS-System kann zur Anreicherung (positive Selektion) oder zur Depletion (negative Selektion) von Zellpopulationen verwendet werden.

$1,0 - 4,0 \times 10^8$  PBMC's ( $400 \mu\text{l}$  PBS /  $1,0 \times 10^8$  PBMC) wurden mit  $100 \mu\text{l}$  bis  $400 \mu\text{l}$  CD14<sup>+</sup>-*MicroBeads* (Miltenyi Biotec) in einem sterilen 50 ml-Gefäß versetzt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach 15 min wurde das 10-fache Volumen an PBS auf das Zell/*MicroBead*-Gemisch gegeben und 5 min bei  $300 \times g$  gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in  $0,5 - 2,0 \text{ ml}$  PBS/EDTA/BSA-Puffer aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension mit dem Programm „poseld“ (positive Selektion) im AutoMACS® aufgereinigt. Aus der positiven Fraktion wurde ein Aliquot entnommen und mit PBS 1:10 verdünnt. Damit erfolgte die Bestimmung der Monozytenzahl am Automatischen Hämatologieanalysator KX-21N.

PBS/EDTA-Puffer	PBS (1x)
	2 mM EDTA
	0,22 $\mu\text{m}$ filtriert
PBS/EDTA/BSA-Puffer	PBS (1x)
	2 mM EDTA
	0,5 % (w/v) BSA
	0,22 $\mu\text{m}$ filtriert
Ethanol 70%	Ethanol absolut puriss. p. a.
	Aqua B. Braun

### **2.2.3 Bestimmung der Leukozytenzahl mit dem Automatischen Hämatologieanalysator KX-21N (Sysmex)**

Die Leukozytenzahl wurde am Automatischen Hämatologieanalysator KX-21N (Sysmex) bestimmt. Das Gerät arbeitet mit dem Impedanzmeßprinzip. Zwei ineinanderstehende Gefäße enthalten eine Elektrolytlösung. Im äußeren Gefäß befinden sich die Zellen, die durch eine Meßöffnung in das innere Gefäß gesaugt werden. Es fließt ein schwacher Gleichstrom und die inneren und äußeren Elektroden registrieren dabei Spannungsänderungen. Zellen sind nur sehr gering leitfähig und setzen beim Passieren der Elektrolytlösung ein Signal ab, das proportional zur Zellgröße ist.

### **2.2.4 Kultivierung und Stimulation der Monozyten für die durchflusszytometrische Untersuchung**

CD14<sup>+</sup>-Zellen wurden nach der Aufreinigung am AutoMACS® auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit DC-Medium eingestellt. Es wurden 1 ml Zellsuspension in eine Vertiefung einer 24 well-Platte pipettiert und verschiedene Stimulationsvariationen durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für bis zu 6 Tage inkubiert.

Für die Kultivierung der Zellen über 5 Tage wurden die Zellen entweder nur mit DC-Medium inkubiert oder das DC-Medium wurde mit 1000 IU/ml IL-4 und 1000 IU/ml GM-CSF komplettiert und die Zellen dann jeweils mit 3 µM – 300 nM R848, 1 mM – 100 µM Loxoribine, 1 µg/ml – 0,1 µg/ml Gardiquimod, 1 µM iODN 2088, 2,5 µM iODN 20958 und 2,5 µM iODN 20959 stimuliert. Am dritten Tag der Kultivierung wurde die Hälfte des DC-Mediums durch frisches ersetzt und wieder mit der entsprechenden Stimuli-Konzentration angereichert.

Die Kultivierung der Zellen über 6 Tage erfolgte mit komplettiertem DC-Medium mit und ohne 3 µM R848. Am dritten Tag wurden die Zellen 3 x mit DC-Medium gewaschen und dann für weitere 3 Tage mit DC-Medium oder mit komplettiertem DC-Medium inkubiert.

Für den T-Zell-Proliferationstest wurden die Zellen 3 Tage mit komplettiertem DC-Medium mit und ohne 3  $\mu$ M R848 kultiviert.

DC-Medium	RPMI 1640 mit Glutamin 10 % FCS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 1 % HEPES 1 % nicht-essentielle Aminosäuren 1 % Natriumpyruvat
Komplettiertes DC-Medium	DC-Medium  1000 IU/ml IL-4 1000 IU/ml GM-CSF

### 2.2.5 Durchflusszytometrie (FACS: *fluorescent activating cell sorting*)

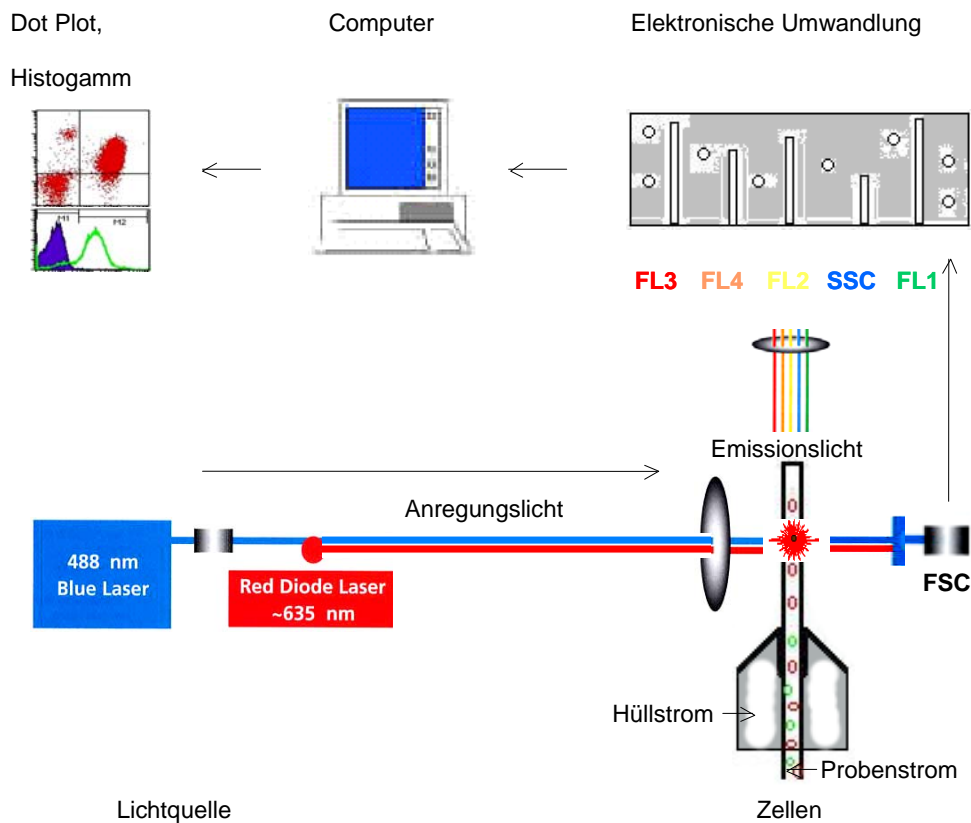
Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die phänotypischen Eigenschaften der, mit dem AutoMACS® aufgereinigten, Monozyten nach den verschiedenen Stimulationsvarianten bestimmt. Die Messungen wurden am FACSCalibur™ und FACSCanto II™ durchgeführt. Die Aufnahme und Auswertung der Zellparameter erfolgten mit Hilfe der Software CellQuest™, WinMDI (Version 2.8) und DIVA6.1.™.

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Oberflächenmoleküle und intrazellulären Proteine. Grundlage der FACS-Analyse ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Das Messprinzip beruht auf der Methode der hydrodynamischen Fokussierung (siehe Abb. 2.2.5.1).

Eine Zellsuspension wird durch einen Hüllstrom verdünnt und die Zellen passieren anschließend einen rechtwinklig zum Probenfluß angeordneten monochromatischen Laserstrahl. Zellen in Größen von 0,2 bis 20 µm werden mit Geschwindigkeiten zwischen 2 und 200 Ereignissen pro Sekunde am Laserstrahl vorbeigeführt. Die Zuführung des Probenstroms liegt typischerweise zwischen 10 und 60 µl/min.

Am Messpunkt werden Lichtstreuung und Fluoreszenzen der einzelnen Zellen gemessen. Als physikalische Messgrößen werden die Lichtstreuung der Zellen in einem engen Winkel zum Laserlicht als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*; FCS) und die Lichtstreuung der Zellen im Winkel von 90° als Seitwärtsstreulicht (*side scatter*; SSC) erfasst. FSC ist grob betrachtet ein Maß für die Größe der Zellen und SSC hängt hauptsächlich von der Granulärität und der Binnenstruktur der Zellen ab. Die Lichtstreuung wird mit zunehmendem Winkel zum Laserstrahl schwächer, deshalb werden die in alle Richtungen ausgesandten Fluoreszenzsignale ebenfalls in einem Winkel von 90° detektiert. Hierzu werden Bandpassfilter und Farbteilerspigel für die optische Trennung der Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome eingesetzt. Die unterschiedlichen Lichtsignale der Fluorochrome werden dann über den Photomultiplier detektiert und in elektrische Signale umgewandelt. So erkennt der FL1-Detektor nach Anregung mit dem blau-grünen Licht eines 488-nm-Argon-Lasers grünes, der FL2-Detektor oranges und der FL3-Detektor rotes Licht.





**Abb. 2.2.5.1: Schematische Darstellung der FACS-Messung. Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung übernommen von (116).**

Die fluoreszenzmarkierten Zellen werden mit dem Probenstrom in die Messzelle geleitet. Der Hüllstrom beschleunigt die Zellen und führt sie einzeln hintereinander in die Mitte des Probenflusses zur Messkapillare (hydrodynamische Fokussierung). Wenn die Zelle die Lichtquelle passiert, wird ein Fluorochrom angeregt und als Emissionslicht zum Photomultiplier geleitet. Das Lichtsignal wird verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Der Computer berechnet angehende Signale und zeigt diese digital an (Histogramm, *Dot Plot*).

Vor der eigentlichen Messung am Durchflusszytometer muss eine Korrektur der Messdaten für Fluoreszenzsignale entsprechend der spektralen Überlappung der Farbstoffe erfolgen, die sogenannte Kompensation. Die eingesetzten Farbstoffe überlappen sich in ihren Emissionsspektren, so dass jeweils Mischungen mit verschiedenen Anteilen von Farbstoffen detektiert werden. Eine nicht kompensierte Messung für nur einfach gefärbte Zellen zeigt z.B. Mischsignale auf zwei Detektoren.

Dazu wurden FACS-Röhrchen mit 100 µl *Staining buffer* gefüllt und je 1 Tropfen BD™ *CompBeads Negative Control* bzw. BD™ *CompBeads* Anti-Mouse Ig, κ zugegeben. Dann wurden 2,5 – 10 µl der entsprechenden primären Antikörper als Einzelfärbung in die Röhrchen gegeben und 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die *Beads* mit je 2 ml *Staining buffer* bei 200 x g für 10 min gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 500 µl *Staining buffer* gelöst.

Zur Messung der Reinheit der Zellen wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben und mit 2,5 µl CD14 FITC bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle markiert. Die Inkubation der Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte 15 min bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurde zu den Zellen 2 ml PBS-Azid gegeben und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 300 µl *Cellfix*™ (1x) gelöst. Die Zellsuspension wurde bis zur Analyse am FACSCalibur™ bzw. FACSCanto II™ bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Zur Phäotypisierung der unterschiedlich stimulierten Monozyten wurde die Zellsuspension auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml mit PBS eingestellt und pro FACS-Röhrchen je 100 µl Zellsuspension mit 2,5 – 10 µl primären Antikörpern (CD1a APC, CD14 FITC, CD25 APC, CD25 PE, CD40 PE, CD83 PE, CD86 PE, CD122 PE, CD123 FITC, BDCA-1 PE, BDCA-2 PE, BDCA-4 PE, HLA-DR PE) bzw. den entsprechenden Isotypkontrollen versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4°C im Dunkeln wurden 2 ml PBS-Azid zugegeben und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 300 µl *Cellfix*™ (1x) resuspendiert und die

Zellsuspension bis zur Analyse am FACSCalibur™ bzw. FACSCanto II™ bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Neben der Oberflächenfärbung der Zellen wurde auch eine Intrazellulärfärbung durchgeführt. Dazu wurden die Oberflächenmoleküle der Zellen zunächst wie schon beschrieben markiert (CD1a APC, CD14 FITC, CD25 PE, CD123 FITC, HLA-DR PE bzw. den entsprechenden Isotypkontrollen). Nach einer Inkubation von diesmal 20 min bei 4°C im Dunkeln wurden je 1 ml *Staining buffer* in die Röhrchen gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 250 x g für 5 min. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und je 1 ml FOXP3 *Fix/Perm Solution* zugegeben. An eine Inkubationszeit von 20 min bei RT im Dunkeln schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei 250 x g an. Nun wurde das Zellpellet dekantiert und je 1 ml *Staining buffer* pro Röhrchen hinzugegeben. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 250 x g wurden die Zellpellets mit je 1 ml FOXP3 *Perm Solution* resuspendiert und wiederum 5 min bei 250 x g gewaschen. Die Überstände wurden abgenommen und die Pellets mit je 1 ml FOXP3 *Perm Solution* gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT im Dunkeln wurden die Zellen erneut 5 min bei 250 x g zentrifugiert und anschließend dekantiert. Die Zellpellets wurde mit je 100 µl FOXP3 *Solution* resuspendiert und mit je 3 µl primärem Antikörper (FOXP3 AlexaFluor647) markiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT im Dunkeln wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml *Staining buffer* bei 250 x g für 5 min gewaschen. Die Überstände wurden abgenommen und die Zellpellets mit je 300 µl *Staining buffer* gelöst. Die Zellsuspension wurde bis zur Analyse am FACSCanto II™ bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

*Cellfix™* (1x)

*Cellfix™* (10x)

PBS (1x)

FOXP3 *Fix/Perm*  
*Solution*

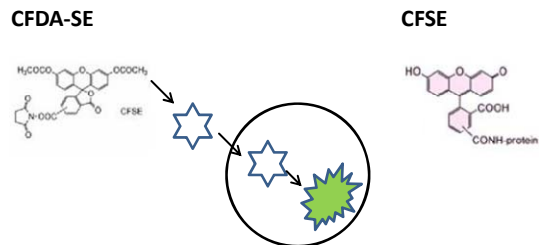
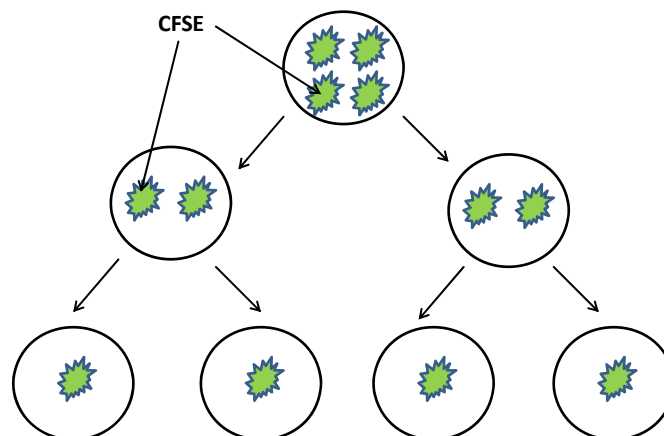
PBS 1(x)

25 % FOXP3 *Fix/Perm Buffer* (4x)

<i>FOXP3 Perm Solution</i>	PBS 1(x)
	10 % FOXP3 Perm Buffer (10x)
PBS-Azid 0,1%	PBS (1x)
	0,1 % Natriumazid
<i>Staining buffer</i>	PBS-Azid 0,1 %
	1 % FCS

### 2.2.6 T-Zell-Proliferationstest

Carboxyfluoreszeindiazetat-Succinimidylester (CFDA-SE) ist eine membrangängige Substanz, die durch Diffusion in die Zellen gelangt. Intrazellulär verliert die Substanz, nach Abspaltung der Diazetatgruppe (Carboxyfluoreszein-Succinimidylester, CFSE) durch Esterasen, ihre Permeabilität und beginnt zu fluoreszieren. CFSE wird dabei über die Estergruppe kovalent an zytoplasmatische Proteine gebunden, ohne dabei Zellfunktionen wesentlich zu beeinträchtigen, wenn eine bestimmte Konzentration bei der Färbung nicht überschritten wird. Bei einer Zellteilung verteilt sich das vorhandene CFSE gleichmäßig auf beide Tochterzellen. Aufgrund des geringeren Fluoreszenzsignals kann am Durchflusszytometer nun auf die zurückliegenden Teilungsschritte der einmal markierten (gelabelten) Zellen geschlossen werden (siehe Abb. 2.2.6.1). Die CFSE-Peaks werden in der FL1 am Durchflusszytometer gemessen.

**A****B**

**Abbildung 2.2.6.1: Schematische Darstellung des CFDA-SE-Labeling und der Verteilung des CFSE auf die Tochterzellen.**

**A** Im ersten Labelingschritt diffundiert CFDA-SE durch die Zellmembran, danach wird es durch Esterasen gespalten und das fluoreszierende CFSE kann nicht mehr zurückdiffundieren. **B** Bei einer Zellteilung wird das intrazellulär vorhandene CFSE gleichmäßig auf

die Tochterzellen verteilt. Die dadurch bedingte niedrigere Fluoreszenz der proliferierten Zellen lässt sich am Durchflusszytometer messen.

Um die Fähigkeit der Proliferationsanregung der T-Zellen durch die verschieden stimulierten Monozyten zu erfassen, wurde eine MLR (engl. *Mixed Lymphocyte-Reaction*) durchgeführt. Die MLR dient *in vitro* als Modell für die Aktivierung von T-Zellen. Bei einer einfachen MLR kultiviert man bestrahlte PBMC's eines Spenders (Stimulatorzellen) mit z.B. CFDA-SE markierten PBMC's eines anderen (allogenen) Spenders (Responderzellen). Die Responder-T-Zellen proliferieren umso stärker, je verschiedener die HLA-Typen der beiden Spender sind. Als Positiv-Kontrolle werden die Responderzellen mit löslichen Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD3 und CD28 stimuliert. Über eine Kreuzvernetzung des T-Zell-Rezeptor-Komplexes durch anti-CD3 und des kostimulatorischen Rezeptors durch anti-CD28 werden verschiedene Signalkaskaden, die zur T-Zell-Aktivierung führen, ausgelöst.

Zur Optimierung der Proliferationsbedingungen wurden zunächst viele Vorversuche durchgeführt, in denen die optimale CFDA-SE-Konzentration, die CFDA-SE-Inkubationszeiten, das Stimulator-Responder-Verhältnis sowie die Kultivierungsdauer ermittelt wurden.

Für die Experimente wurden PBMC's aus einem *buffy coat* mittels der Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen, die als Responderzellen fungierten. Die Zellzahl wurde mit DC-Medium auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und die Zellen anschließend für 5 min mit  $1 \mu\text{M}$  CFDA-SE (Vybrant® CFDA-SE *Cell Tracer Kit* von Molecular Probes) im Dunkeln bei  $38^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Die Lebendfärbung wurde dann durch Zugabe von 5 ml DC-Medium unterbrochen. Es folgten 2 Waschschrte mit jeweils 5 ml DC-Medium und einer Zentrifugation der Zellsuspension bei  $300 \times g$  für 5 min. Die Bestimmung der Leukozytenzahl erfolgte am Automatischen Hämatologieanalysator KX-21N. Nach Einstellen der Zellzahl auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit DC-Medium wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in eine 96 *well*-Rundboden-Platte ausgesät.

Die 3 Tage zuvor mit komplettiertem DC-Medium mit und ohne 3  $\mu\text{M}$  R848 stimulierten Monozyten (Stimulatorzellen, allogener Spender) wurden aus ihren *wells* gelöst, 3 x mit DC-Medium gewaschen und nach einer letzten Zentrifugation von 5 min bei 300 x g auf eine Zellzahl von je  $2,5 \times 10^5/\text{ml}$  mit DC-Medium eingestellt. Auch von diesen Zellsuspensionen wurden je 100  $\mu\text{l}$  pro well in die 96 *well*-Rundboden-Platte pipettiert, so dass in den *wells* ein Stimulator-Responder-Verhältnis von 1:5 herrschte. Als Positiv-Kontrolle dienten markierte Responderzellen, die mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD3 und anti-CD28 behandelt wurden. Die Negativ-Kontrollen bestanden einerseits aus unmarkierten Responderzellen und andererseits aus den verschiedenen Stimulatorzellen. Die MLR wurde für 5 - 7 Tage bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Bei der 7 Tage Kultur wurde am dritten Tag die Hälfte des DC-Mediums durch frisches ersetzt und wieder mit der entsprechenden Konzentration an anti-CD3 und anti-CD28 angereichert.

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden die Zellen der MLR, sowie die Kontrollen aus ihren *wells* gelöst und die Zellzahl auf  $2 \times 10^6/\text{ml}$  mit PBS eingestellt und pro FACS-Röhrchen je 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 1,5 - 2,5  $\mu\text{l}$  primärem Antikörper (CD3 Pacific Blue, CD4 APC/H7, CD11b/Mac-1 APC) bzw. den entsprechenden Isotypkontrollen versetzt. Die Inkubation erfolgte 15 min im Kühlschrank. Anschließend wurde zu den Zellen 2 ml PBS-Azid gegeben und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 300  $\mu\text{l}$  *Cellfix*<sup>™</sup> (1x) gelöst. Die Zellsuspension wurde bis zur Analyse am FACSCanto II<sup>™</sup> bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

DC-Medium	RPMI 1640 mit Glutamin
	10 % FCS
	1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
	1 % HEPES
	1 % nicht-essentielle Aminosäuren
	1 % Natriumpyruvat

Komplettiertes DC-Medium	DC-Medium  1000 IU/ml IL-4 1000 IU/ml GM-CSF
PBS-Azid 0,1%	PBS (1x) 0,1 % Natriumazid
<i>Staining buffer</i>	PBS-Azid 0,1% 1 % FCS

### 2.2.7 Kultivierung und Stimulation der Monozyten für den *Cytometric Bead Array* (CBA)

Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 96 *well*-Rundboden-Platten ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über 6 Tage mit komplettiertem DC-Medium mit und ohne 3  $\mu$ M R848. Am dritten Tag wurden die Zellen 3 x mit DC-Medium gewaschen und wieder mit komplettiertem DC-Medium inkubiert. Die Hälfte der Zellen wurde 12 h nach dem Waschen für 24 h mit 1  $\mu$ g/ml LPS und 3  $\mu$ g/ml CpG 2006 stimuliert. Die zweite Hälfte der Zellen wurde 72 h nach dem Waschen für 24 h mit 1  $\mu$ g/ml LPS und 3  $\mu$ g/ml CpG 2006 stimuliert. Nach jeweils 24 h Stimulation wurden die Platten 10 min bei 300 x g zentrifugiert, die Überstände abgenommen und bei -80°C eingefroren.

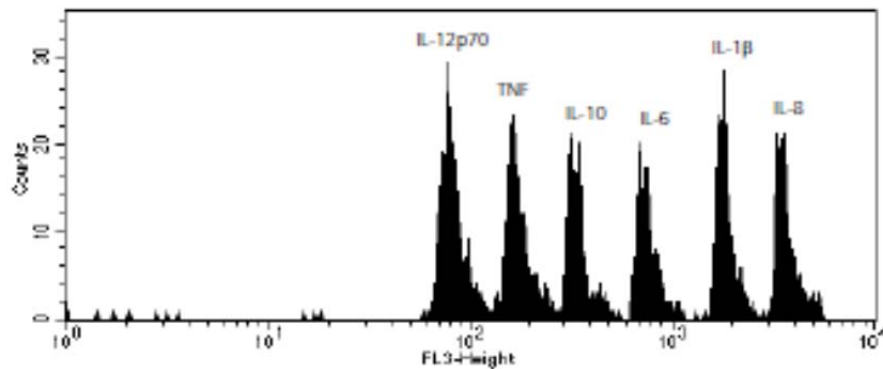


### 2.2.8 *Human Inflammatory Cytokines Cytometric Bead Array (CBA)*

Der *Cytometric Bead Array* (CBA) basiert auf einem Partikel-gebundenen Immunttest, ein relativ neues Analysenprinzip. Der hier verwendete CBA beinhaltet mehrere verschiedene Partikel (*Beads*) mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Intensitäten. Auf den unterschiedlichen *Bead*-Populationen werden die entsprechenden, gegen das zu bestimmende Protein gerichteten, Antikörper fixiert (*Capture Beads*). Jeder *Capture Bead* ist somit vergleichbar mit einem gecoateten well einer ELISA-Platte. Es werden mehrere *Capture Bead*-Populationen miteinander gemischt, um gleichzeitig mehrere lösliche Analyten, im sog. Multiplexverfahren, in einer einzigen Probe zu detektieren. Nachdem die *Capture Beads* mit der Probe inkubiert wurden, werden die, gegen die zu detektierenden Proteine gerichteten, PE-konjugierten Antikörper (*PE Detection Reagent*) zugegeben und die Fluoreszenz von einem FL3- oder FL4-Detektor gemessen (siehe Abb. 2.2.7.1). Die Proteinkonzentrationen in der Probe werden mittels Vergleich der Anzahl der detektierten *Beads* der Standards bekannter Konzentrationen anhand von Standardkurven ermittelt. Das Prinzip der Durchflußzytometrie wurde weiter oben schon ausführlich beschrieben.

Mit dem *Human Inflammatory Cytokines CBA* können Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Interleukin-12p70 (IL-12p70) quantitativ gemessen werden. Neben Überständen aus Zellkulturen kann auch EDTA-Plasma und Serum untersucht werden.

Im Vergleich zu den gängigen auf dem Markt befindlichen *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAS's) können mit dem gleichen Probevolumen wie man für einen Zytokin-ELISA bräuchte gleich mehrere Zytokine bestimmt werden und das alles in einem Bruchteil der Zeit.



**Abb. 2.2.8.1:** Als Beispiel abgebildet ist eine Probenmessung mit den 6 im Kit enthaltenen *Beads*.

Gemessen wurden die Fluoreszenz-Intensitäten mit dem FL3-Detektor (Abszisse). Die quantitative Konzentration der einzelnen Zytokine ist auf der Ordinate dargestellt.

Vor Beginn des eigentlichen Tests musste ein *Cytometer Setup Bead Procedure* durchgeführt werden. Dafür wurden 50 µl der *Cytometer Setup Beads* in 3 Röhrchen gegeben. Zu einem Röhrchen wurde 50 µl FITC *Positive Control* und zu einem anderen Röhrchen wurde 50 µl PE *Positive Control* pipettiert. Nach 30 min Inkubationszeit bei RT im Dunkeln wurden 400 – 450 µl Waschpuffer pro Röhrchen zugegeben und das *Cytometer Setup* am Durchflusszytometer FACSCanto II™ durchgeführt.

Zu Beginn des Tests wurden die 6 verschiedenen Standards mit je 2 ml *Assay Diluent* rekonstituiert und ca. 15 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden serielle 1:2 Standard Verdünnungen hergestellt, bei denen die höchste Standard-Konzentration 5000 pg/ml und die niedrigste 20 pg/ml betrug. Zusätzlich wurde noch ein Leerwert mit 0 pg/ml benötigt. Die 6 verschiedenen *Capture Beads* wurden miteinander vermischt und je 50 µl in ein Teströhrchen überführt. Danach wurden je 50 µl der Standard-Verdünnungen, der Leerwerte und der 1:2 mit *Assay Diluent* verdünnten Proben in die Röhrchen pipettiert.

Anschließend wurden noch je 50 µl des PE *Detection Reagent* zugegeben. Es schloss sich eine Inkubationszeit von 3 Stunden bei RT im Dunkeln an. Um nicht gebundene Zytokine und Antikörper zu entfernen wurden die Röhrchen mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen. Das *Bead-Pellet* wurde anschließend mit 300 µl Waschpuffer gelöst und die Proben am FACSCanto II™ analysiert.

Mit dem Programm FCAP Array™ V 1.0.1 wurden die Standardkurven erstellt, die das Berechnen der Zytokinkonzentrationen in den Proben ermöglichten.

### 3 Ergebnisse

Resiquimod (R848) stellt einen neuartigen Immunmodulator dar, der seine Wirkung über den TLR7 und TLR8 entfaltet. Um Rückschlüsse auf eine durch R848 ausgelöste Modulation der Immunantwort ziehen zu können und somit den Wirkstoff in Zukunft effektiv in der klinischen Therapie einzusetzen, wurden im Rahmen dieser Dissertation weitergehende Untersuchungen an *in vitro* generierten MoDC's durchgeführt.

So wurden mittels FACS-Analysen die Wirkungen verschiedener TLR7- und TLR7/8-Liganden auf die MoDC-Differenzierung und –Reifung untersucht. Nach der Stimulation der MoDC's mit R848 entstand eine neue Zellpopulation, so dass verschiedene inhibitorische ODN's eingesetzt wurden, um den *Toll-like* Rezeptor zu identifizieren, durch den die Modulation der *in vitro* generierten MoDC's hervorgerufen wurde. Um die funktionelle Rolle von R848 auf MoDC's weiter zu charakterisieren wurde die neu entstandene Zellpopulation noch auf ihre Fähigkeit hin untersucht allogene T-Zellen zur Proliferation anzuregen und nach Restimulation verschiedene Zytokine zu produzieren.

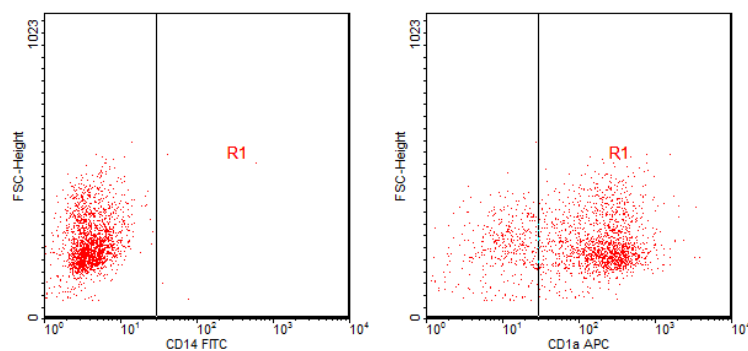
#### 3.1 Der TLR7/8-Ligand R848 modifiziert dosisabhängig die Differenzierung konventioneller MoDC's

Monozyten wurden aus Restmaterialien (*buffy coats*) gesunder Blutspender mit Hilfe der Ficoll-dichtegradientenzentrifugation und anschließender Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator isoliert (siehe 2.2.1 und 2.2.2). Die Reinheit der isolierten Monozyten betrug > 95%. Anschließend wurden die Zellen mit 1000 IU/ml GM-CSF/IL-4 mit und ohne R848 für 5 Tage in Kultur genommen. Der TLR7/8-Ligand R848 wurde dem komplettierten DC-Medium in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt, so dass eine Titrationsreihe von 3 µM, 2,25 µM, 1,5 µM, 750 nM und 300 nM erreicht wurde. Danach wurden die Zellen geerntet und mit verschiedenen Oberflächenantikörpern gefärbt (siehe Abb. 3.1.1).

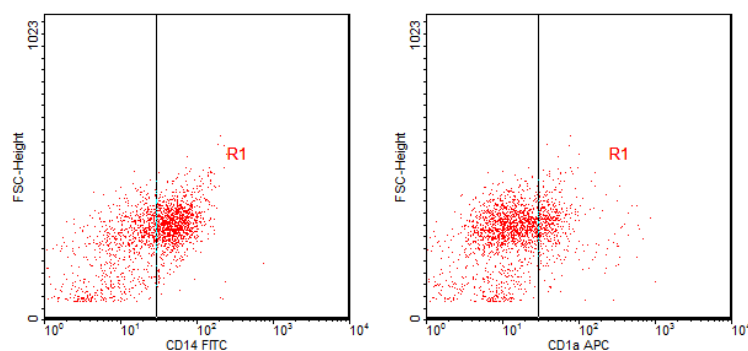
Die aus dem Blut isolierten Monozyten wurden anhand ihres, auf der Oberfläche exprimierten, Moleküls CD14 identifiziert.

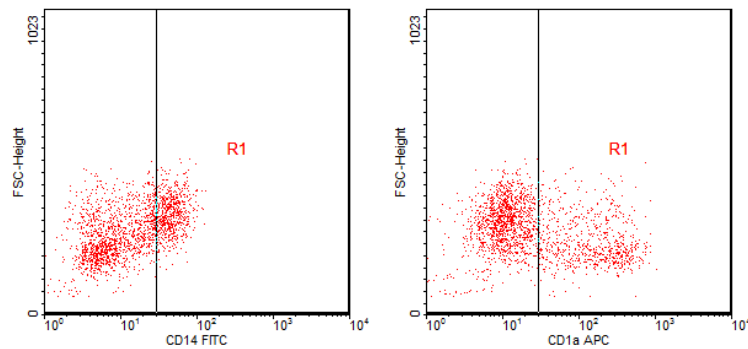
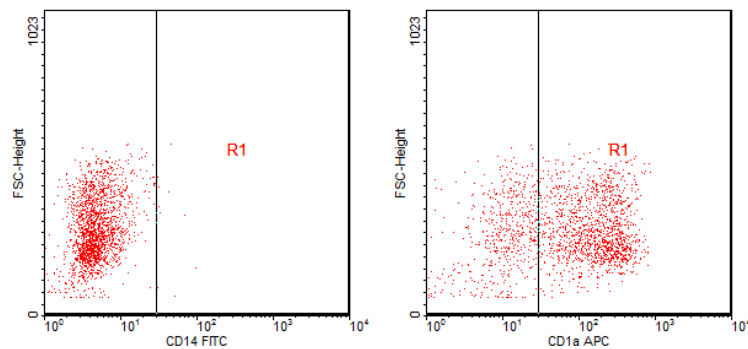
Anhand der Oberflächenmoleküle CD14 und CD1a konnten die aus Monozyten, mit Hilfe von GM-CSF/IL-4, generierten *monocyte-derived dendritic cells*, im weiteren MoDC's genannt, identifiziert werden. MoDC's exprimieren CD1a, aber kein CD14 mehr. Das Oberflächenmolekül CD14 wird vor allem in großem Maße von Monozyten exprimiert, man findet es aber auch auf interfollikulären Makrophagen, retikulären DC's und einigen Langerhans-Zellen. Es fungiert u.a. als LPS-Rezeptor. CD1a findet man vor allem auf DC's, kortikalen Thymozyten und Langerhans-Zellen. Es dient, ähnlich dem MHC-Klasse-II-Molekül (HLA-DR), der Antigen-Präsentation, der Lymphozyten-Aktivierung und -Entwicklung.

**A**



**B**



**C****D**

**Abb. 3.1.1: R848 verändert dosisabhängig die Differenzierung der aus Monozyten expandierten dendritischen Zellen (DC's). FACS-Analyse eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M – 300 nM R848 über 5 Tage.**

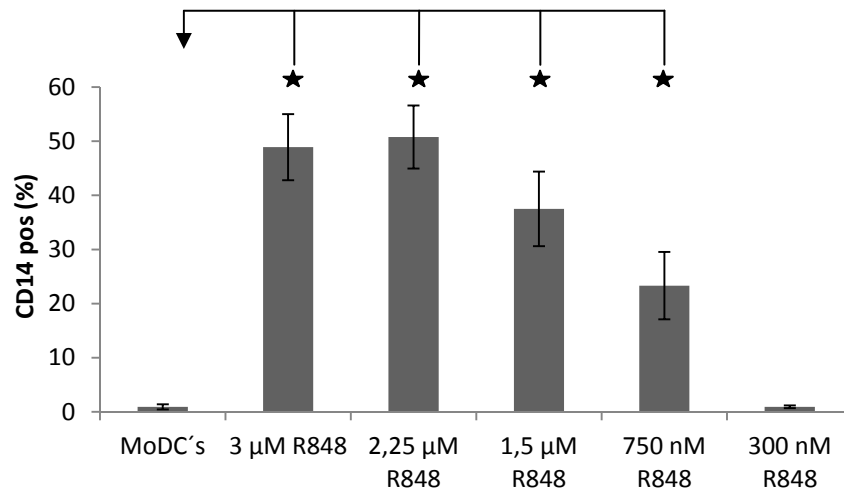
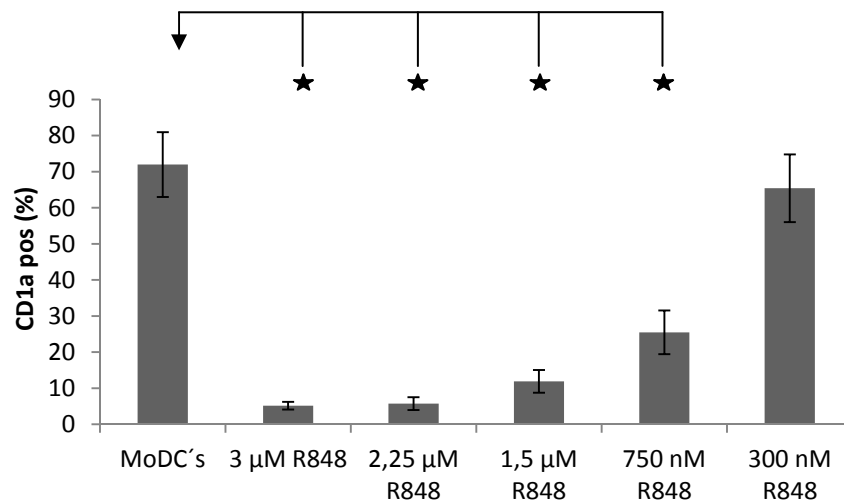
**A** Färbung der MoDC's mit FITC anti-human CD14 und APC anti-human CD1a; **B** Färbung der 3  $\mu$ M R848-DC's s.o.; **C** Färbung der 750 nM R848-DC's s.o.; **D** Färbung der 300 nM R848-DC's s.o.. Die entsprechenden Isotypkontrollen wurden mitgeführt.

Die unterschiedlichen FACS-Analysen der mit GM-CSF/IL-4 aus Monozyten generierten DC's, die mit und ohne R848 für 5 Tage kultiviert wurden, ergaben eine signifikante Veränderung in der Differenzierung der DC's.

Die nur mit GM-CSF und IL-4 expandierten Monozyten (konventionelle MoDC's) exprimierten nach 5 Tagen Kultur vor allem das Oberflächenmolekül CD1a. CD14 wurde im Prozess der Differenzierung von Monozyten zu MoDC's deutlich herunterreguliert (Abb. 3.1.1. **A**).

Mit steigender Konzentration von R848 ließ sich eine Veränderung der Differenzierung der MoDC's erreichen. Bei einer Stimulationskonzentration von 300 nM R848 stimmten die so stimulierten MoDC's in ihrem Phänotyp noch mit den konventionellen MoDC's überein (Abb. 3.1.1 **D**). Ab einer Stimulationskonzentration von 1,5  $\mu$ M R848 konnten deutliche Effekte erzielt werden. So zeigten die mit 3  $\mu$ M stimulierten MoDC's deutliche phänotypische Unterschiede. Die CD14-Expression blieb weiterhin erhalten und eine CD1a-Expression wurde zunehmend unterdrückt (Abb. 3.1.1 **B**). Die so entstandenen Zellen werden im Folgenden als R848-DC's bezeichnet.

Anhand der graphischen Darstellung der FACS-Analysen lässt sich eine signifikante, dosisabhängige Veränderung der Differenzierung der aus Monozyten expandierten DC's zeigen. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender Stimulationskonzentration von R848 eine Hemmung von CD1a und eine Persistenz von CD14 stattfindet.

**A****B**

**Abb. 3.1.2: R848 verändert dosisabhängig die Differenzierung der aus Monozyten expandierten dendritischen Zellen (DC's). Graphische Darstellung der z.T. beispielhaft dargestellten FACS-Analysen.**

**A** CD14-Expression (%) und **B** CD1a-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3 µM – 300 nM R848.

Mittelwerte ± stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen n = 4.

★ p < 0,05 versus MoDC's (Kontroll-DC's) (*two-tailed t-test*).



## **3.2 Die Wirkung von R848 auf die DC-Differenzierung ist TLR8 vermittelt**

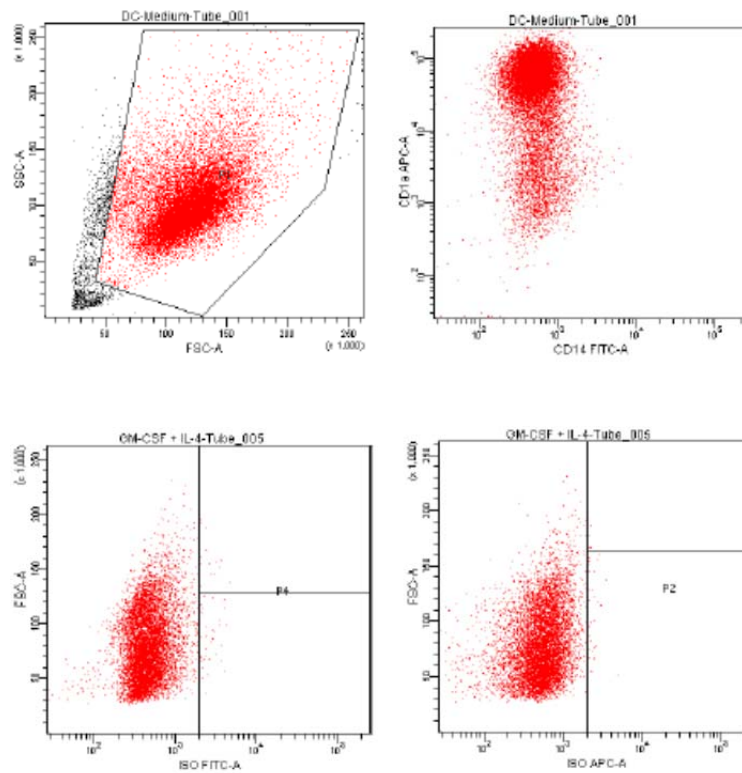
### **3.2.1 Der Einfluss des spezifischen TLR7-Liganden Gardiquimod auf die DC-Differenzierung**

Um festzustellen durch welchen TLR die veränderte Differenzierung der Monozyten hervorgerufen wurde, musste der Einfluss eines spezifischen TLR7-Liganden, der wie R848 ein Imidazoquinolin-Bestandteil ist, auf die Monozyten untersucht werden.

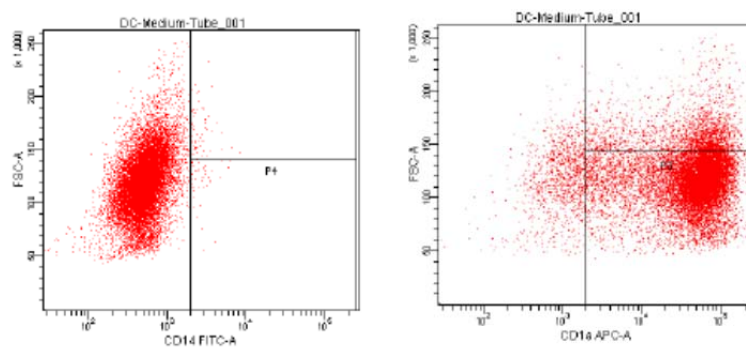
Zunächst wurde also der spezifische TLR7-Ligand Gardiquimod eingesetzt, der nur in hohen Stimulationskonzentrationen ( $> 3 \mu\text{g/ml}$ ;  $> 9 \mu\text{M}$ ) eine leichte TLR8-Wirkung besitzt und deshalb in den folgenden Versuchen nur in niedrigeren Stimulationskonzentrationen eingesetzt wurde.

Monozyten wurden wieder über 5 Tage mit 1000 IU/ml GM-CSF/IL-4 mit und ohne 1 – 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (3,19  $\mu\text{M}$  – 0,319  $\mu\text{M}$ ) Gardiquimod oder 3  $\mu\text{M}$  R848 für 5 Tage in Kultur genommen und anschließend mit verschiedenen Oberflächenantikörpern angefärbt (Abb. 3.2.1.1).

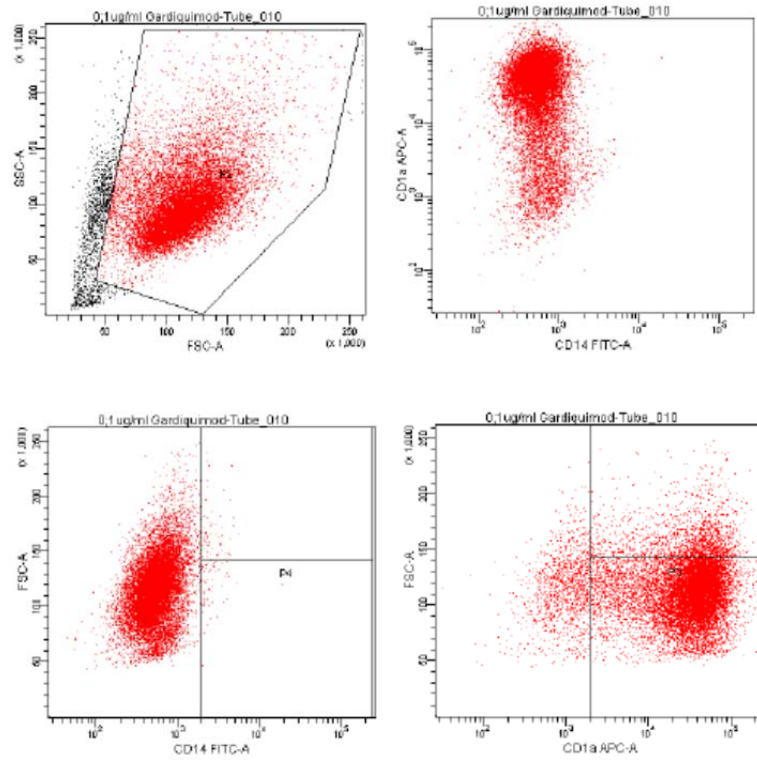
**A**



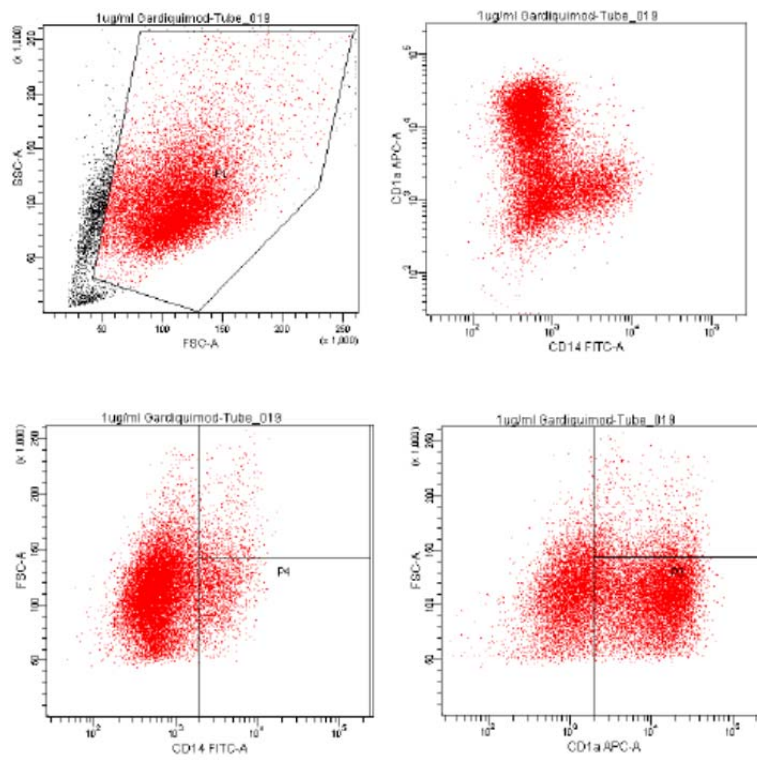
**B**



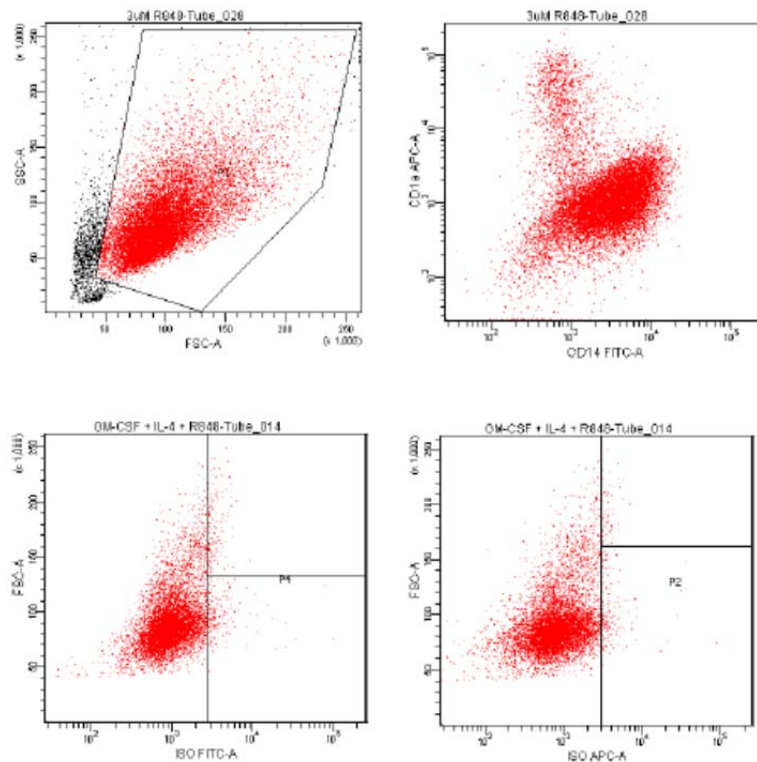
C



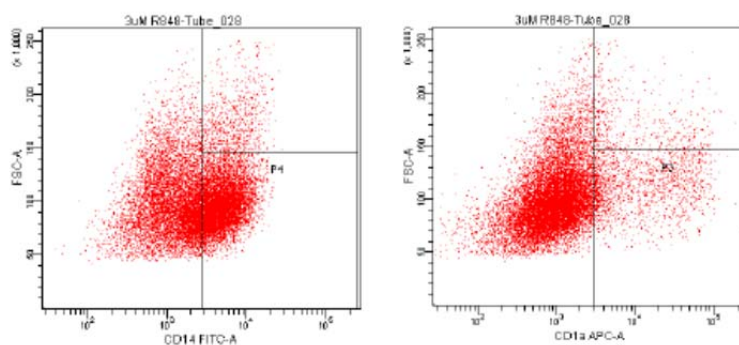
D



E



F



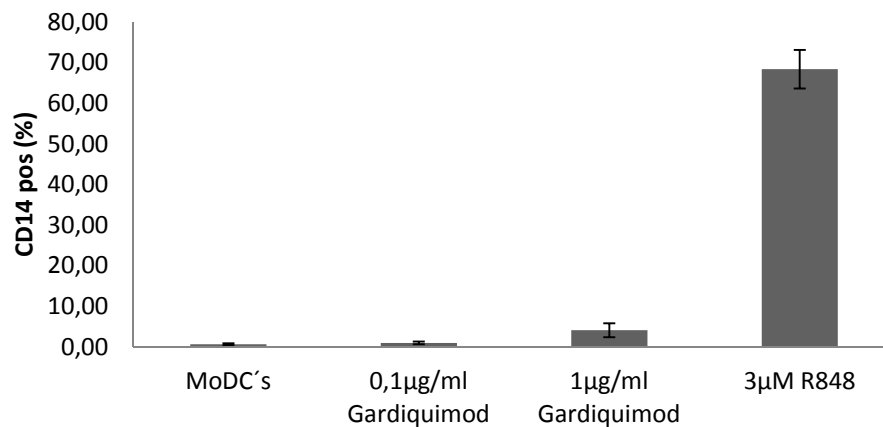
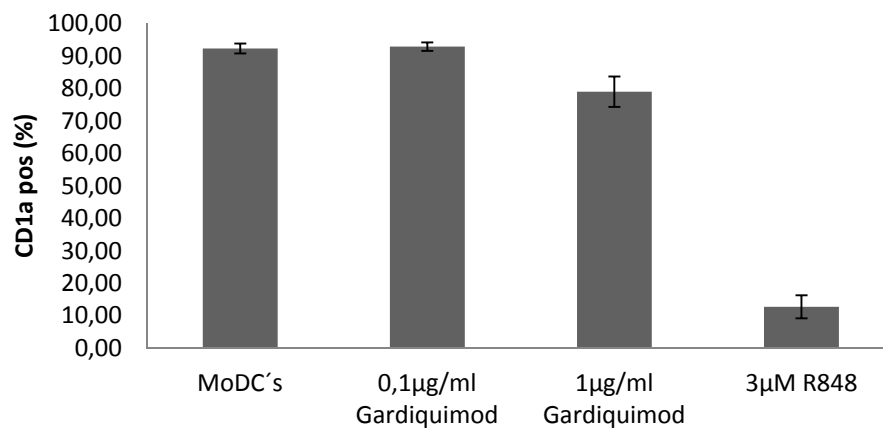
**Abb. 3.2.1.1: Gardiquimod und R848 im Vergleich. Gardiquimod als spezifischer TLR7-Ligand verändert im Gegensatz zu R848 die Differenzierung der aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (MoDC's) nicht. FACS-Analyse eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und**

**ohne 0,1 – 1 µg/ml (0,319 – 3,19 µM) Gardiquimod bzw. 3 µM R848 über 5 Tage.**

**A** Isotypkontrolle der MoDC's; **B** Färbung der MoDC's mit FITC anti-human CD14 und APC anti-human CD1a; **C** Färbung der 0,1 µg/ml (0,319 µM) Gardiquimod-DC's s.o.; Isotypkontrolle 0,1 µg/ml (0,319 µM) Gardiquimod-DC's siehe MoDC's; **D** Färbung der 1 µg/ml (3,19 µM) Gardiquimod-DC's s.o.; Isotypkontrolle der 1 µg/ml (3,19 µM) Gardiquimod-DC's siehe MoDC's; **E** Isotypkontrolle der 3 µM R848-DC's; **F** Färbung der 3 µM R848-DC's s.o..

Es ist deutlich zu erkennen, dass die MoDC's und die Gardiquimod-DC's einen ähnlichen Phänotyp aufweisen. Man kann dieses gut auf einen Blick an den FACS-Analysen erkennen, bei denen CD14 auf der Abszisse und CD1a auf der Ordinate aufgetragen sind (Abb. 3.2.1.1 **A, C, D**). Es sind deutlich die unterschiedlichen Phänotypen der expandierten MoDC's und Gardiquimod-DC's, die das Oberflächenmolekül CD1a exprimieren und zusätzlich CD14 herunterregulieren, von den CD14 pos und CD1a neg R848-DC's zu unterscheiden (Abb. 3.2.1.1 **E**).

Die FACS-Analysen dieser Versuche bestätigten die These, dass die R848-Wirkung nicht über den TLR7, sondern über den TLR8 vermittelt wird, da R848 als TLR7/8-Ligand eine veränderte Differenzierung der Monozyten hervorruft, Gardiquimod, als TLR7-Ligand jedoch nicht.

**A****B**

**Abb. 3.2.1.2: Gardiquimod und R848 im Vergleich. Gardiquimod als spezifischer TLR7-Ligand verändert im Gegensatz zu R848 die Differenzierung der aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (DC's) nicht. Graphische Darstellung der beispielhaft dargestellten FACS-Analysen.**

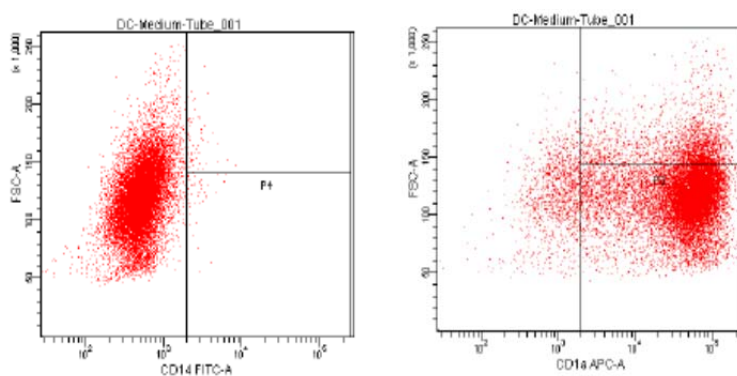
**A** CD14-Expression (%), **B** CD1a-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 und 0,1 – 1 µg/ml (0,319 – 3,19 µM) Gardiquimod oder 3µM R848.

Mittelwerte ± stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen n = 6.

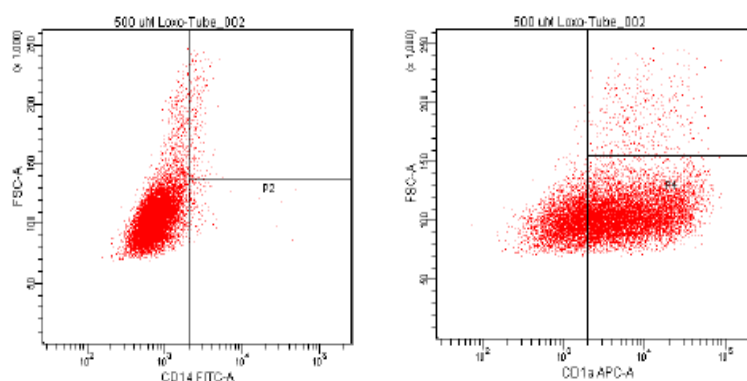
### 3.2.2 Der Einfluss von Loxoribine, eines weiteren TLR7-Liganden, auf die DC-Differenzierung

Da Gardiquimod in sehr hohen Dosen ( $> 3 \mu\text{g/ml}$ ;  $> 9 \text{ mM}$ ) auch eine leichte TLR8 Wirkung besitzt, wurden zusätzliche Experimente mit einem weiteren spezifischen TLR7-Liganden durchgeführt. Zum Vergleich wurde Loxoribine auf seine Wirkung auf die Differenzierung von Monozyten hin untersucht. Die Monozyten wurden wieder 5 Tage mit  $1000 \text{ IU/ml}$  GM-CSF/IL-4 mit und ohne Loxoribine kultiviert und anschließend wie in 3.1 angefärbt. Hier wurde mit dem TLR7-Liganden Loxoribine eine Titrationsreihe mit den entsprechenden Stimulationskonzentrationen zu denen von R848 in 3.1 erstellt ( $1 \text{ mM}$ ,  $500 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$ ).

**A**



**B**

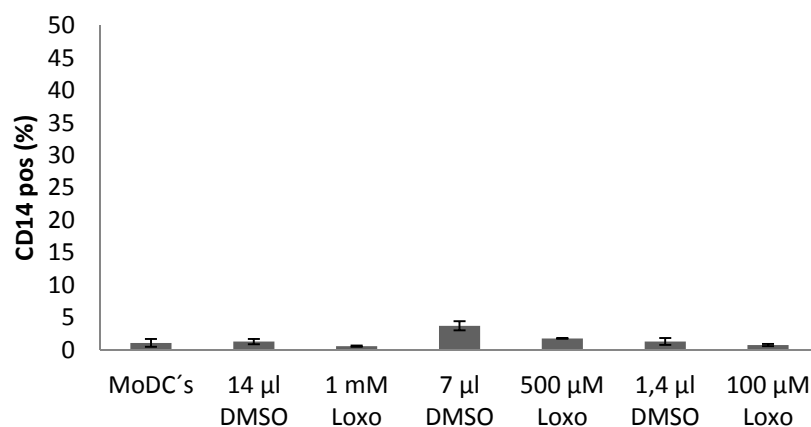


**Abb. 3.2.2.1: Loxoribine hat keinen Effekt auf die Differenzierung der aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (MoDC's). Als Beispiel eine FACS-Analyse eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 500 µM Loxoribine über 5 Tage.**

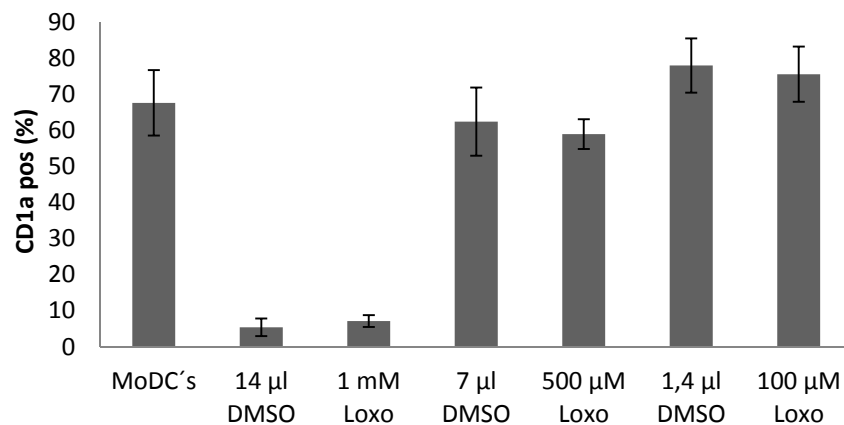
**A** Färbung der MoDC's mit FITC anti-human CD14 und APC anti-human CD1a; **B** Färbung der mit 500 µM Loxoribine stimulierten MoDC's s.o..

Bei der Konzentration von 1 mM Loxoribine waren deutliche zelltoxische Wirkungen zu erkennen, was auf die hohe Konzentration des Lösungsmittels DMSO zurückzuführen war. Bei den zwei nächst niedrigeren Konzentration (500 µM und 100 µM) traten diese toxischen Wirkungen nicht mehr auf. Die FACS-Analysen ergaben aber keine signifikante Veränderung der Differenzierung der Monozyten im Vergleich zu der Kontrolle (MoDC's).

**A**





**B**

**Abb. 3.2.2.2: Loxoribine hat keinen Effekt auf die Differenzierung der aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (MoDC's). Graphische Darstellung der z.T. beispielhaft dargestellten FACS-Analysen.**

**A** CD14-Expression (%) und **B** CD1a-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 1 mM – 100 µM Loxoribine bzw. der entsprechenden, als neg. Kontrolle dienenden, Mengen DMSO (Lösungsmittel).

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen  $n = 3$ .

### 3.2.3 Die Verwendung verschiedener inhibitorischer Oligonukleotide (iODN's) zur Verifizierung der TLR8-Wirkung

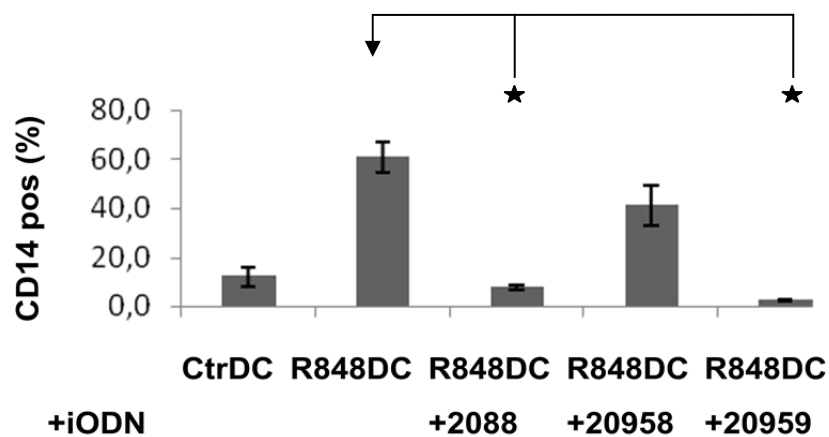
Um die These letztendlich zu bestätigen, wurden Versuche mit spezifischen iODN's angeschlossen. Dazu wurde zu den kultivierten Monozyten ( $\pm 3 \mu\text{M}$  R848) zu Beginn der Kultur entweder iODN 2088 (ein TLR7/8/9-Inhibitor), iODN 20958 (ein TLR7-Inhibitor) oder iODN 20959 (ein TLR7/8-Inhibitor) zugegeben. Die Kulturdauer betrug wieder 5 Tage und danach wurden wieder die Oberflächenmoleküle mit Antikörpern angefärbt.

Nur die iODN's, die auch TLR8 inhibieren (iODN 2088 und iODN 20959) waren in der Lage die R848-Effekte auf MoDC's, wie CD14 Expression und Hemmung der CD1a Expression, zu supprimieren.

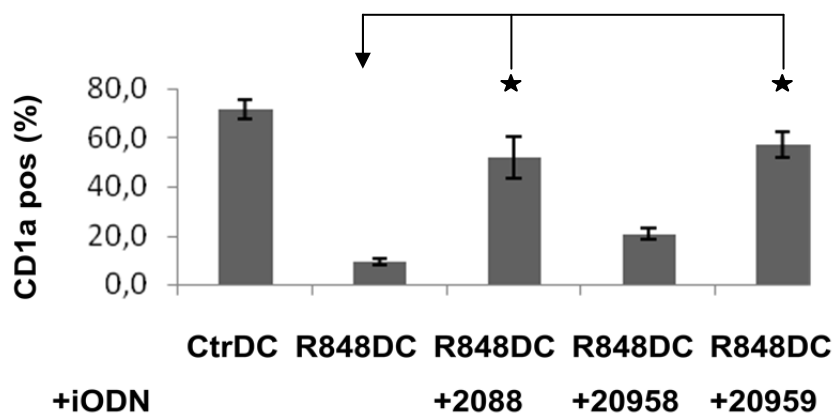
Im Unterschied dazu zeigte iODN 20958, welches nur TLR7 inhibiert, keine Hemmung der R848-Wirkung auf die DC-Differenzierung. Es lässt sich daraus schließen, dass die DC-Differenzierung durch R848 über TLR8 vermittelt wurde.

Die Expression von HLA-DR wurde nicht signifikant von den verschiedenen iODN's beeinflusst. Man kann daher annehmen, dass diese Expression nicht ausschließlich von TLR7 oder TLR8 gesteuert wurde.

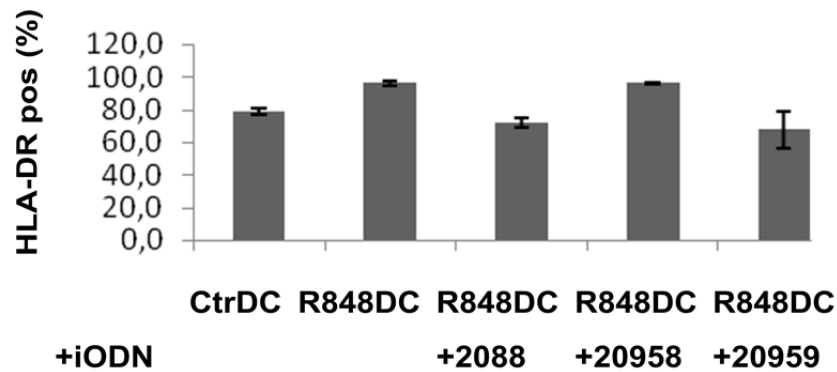
**A**



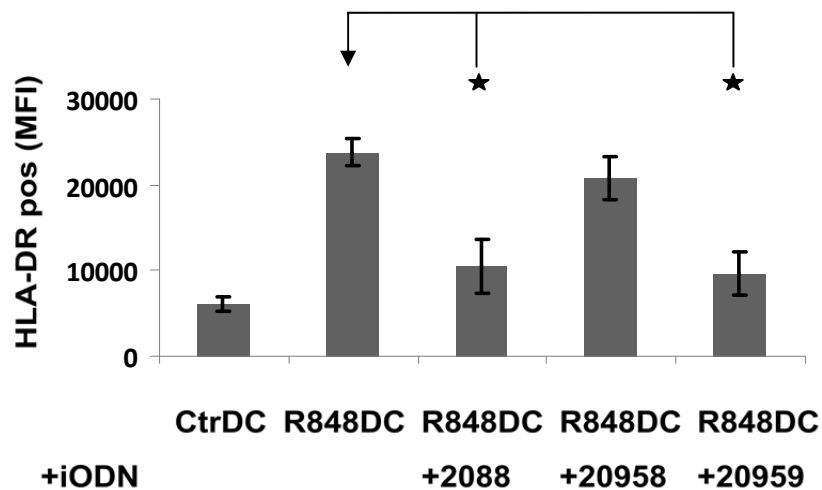
**B**



C



D



**Abb. 3.2.3.1: Die veränderte Differenzierung der DC's mit Hilfe von R848 ist TLR8 vermittelt. Graphische Darstellung.**

**A** CD14-Expression (%), **B** CD1a-Expression (%), **C** HLA-DR-Expression (%) und **D** HLA-DR-Expression (MFI) der MoDC's (CtrDC) und unterschiedlich inhibierten R848-DC's nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4, iODN 2088, iODN 20958, iODN 20959 mit und ohne R848.

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen  $n = 3$ .

★  $p < 0,05$  versus R848-DC's (two-tailed *t*-test).

### **3.3 R848-DC's exprimieren größere Mengen an T-Zell kostimulatorischen Molekülen und HLA-DR**

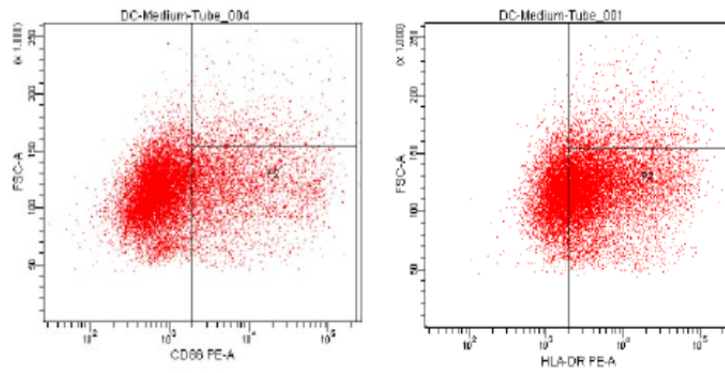
Nach Stimulation der Monozyten für 5 Tage mit GM-CSF/IL-4 und verschiedenen Konzentrationen Gardiquimod bzw. R848 wurden die Zellen geerntet und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmoleküle angefärbt (PE anti-human BDCA-1, PE anti-human BDCA-2, PE anti-human BDCA-4, PE anti-human CD 40, PE anti-human CD83, PE anti-human CD86, PE anti-human CD25, PE anti-human CD123 und PE anti-human HLA-DR).

Die geernteten Zellen wurden wie in den vorherigen Versuchen zusätzlich mit CD14 und CD1a angefärbt, um die unterschiedliche Differenzierung der Monozyten zu überprüfen.

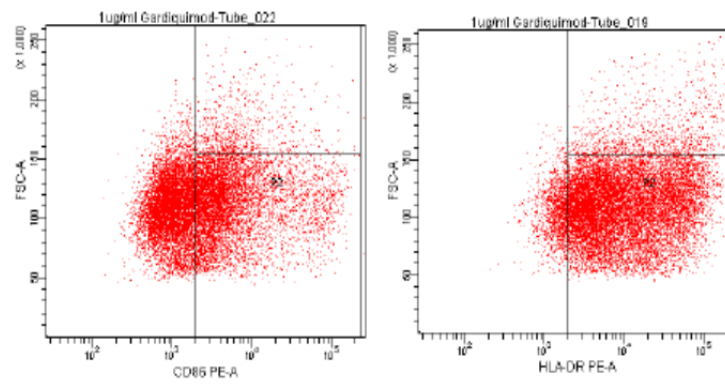
#### **3.3.1 R848-DC's exprimieren größere Mengen an T-Zell kostimulatorischen Molekülen und HLA-DR im Vergleich zu konventionellen MoDC's**

Die Expression der kostimulatorischen Moleküle und des HLA-DR sind von großer immunologischer Bedeutung, da man durch ihre Präsenz eine Aussage über den Reifungsgrad der R848-DC's machen kann. So exprimieren unreife DC's nur geringe Mengen an CD40, CD83 und CD86 auf ihren Oberflächen (Abb.1.3.4.1), während reife DC's, die der Antigenpräsentation fähig sind, in hohem Maße CD40, CD83, CD86 und HLA-DR exprimieren. So stellt u.a. CD86 ein wichtiges Molekül dar, da es zum sog. B7-Komplex gehört und mit CD28 auf den T-Zellen interagiert und somit an einer Auslösung von T-Zell-Antworten beteiligt ist. Ein weiteres wichtiges Molekül für die Interaktion zwischen APC's und CD4<sup>+</sup> T-Zellen stellt HLA-DR dar.

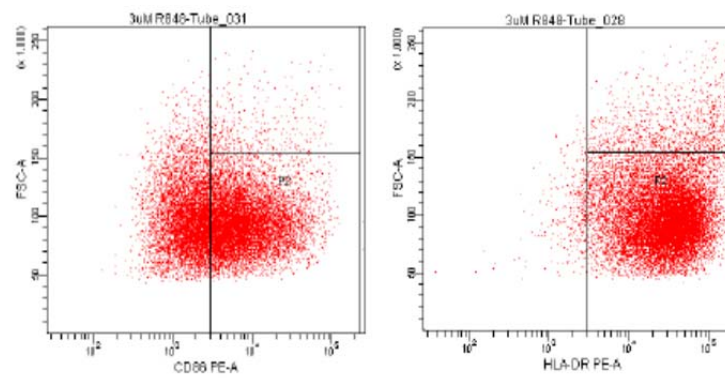
A



B



C



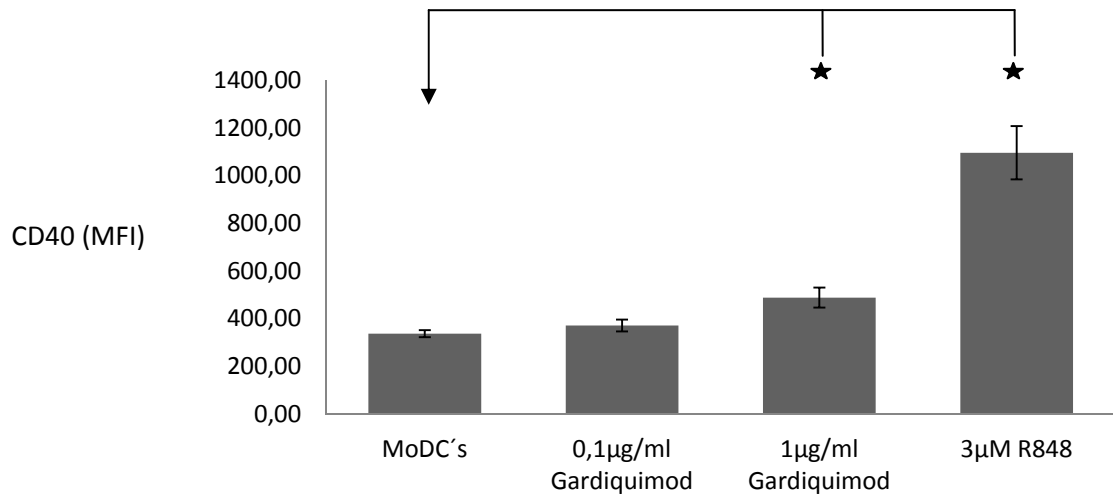
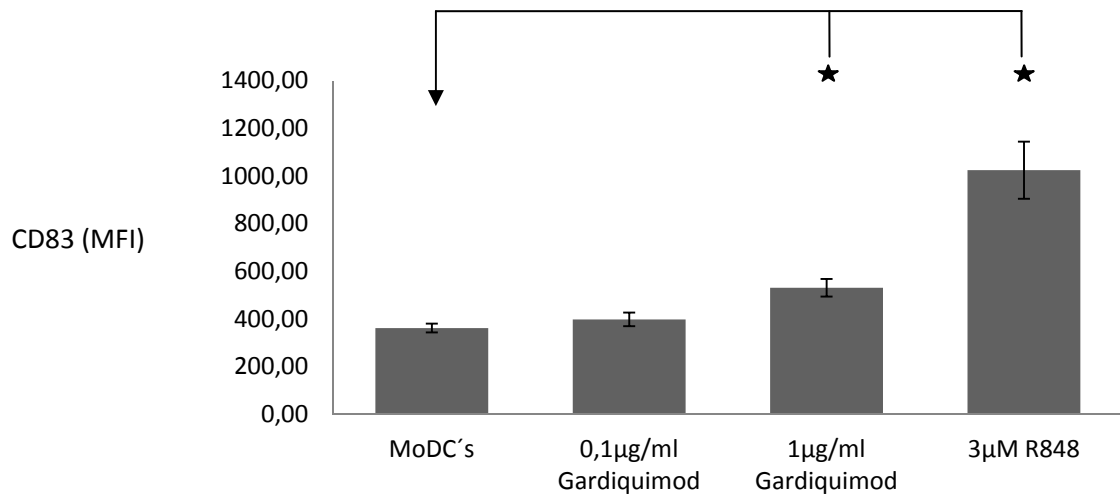
**Abb. 3.3.1.1: Die Expression von CD86 und HLA-DR der R848-DC's im Vergleich zu der Stimulation mit Gardiquimod. R848-DC's exprimieren in höherem Maße kostimulatorische Moleküle als Gardiquimod-DC's und MoDC's. FACS-Analyse eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3 µM R848 oder 1 µg/ml (3,19 µM) Gardiquimod über 5 Tage. A Färbung der MoDC's, B der 1 µg/ml (3,19 µM) Gardiquimod-DC's und C der 3 µM R848-DC's mit PE anti-human CD86 und PE anti-human HLA-DR.**

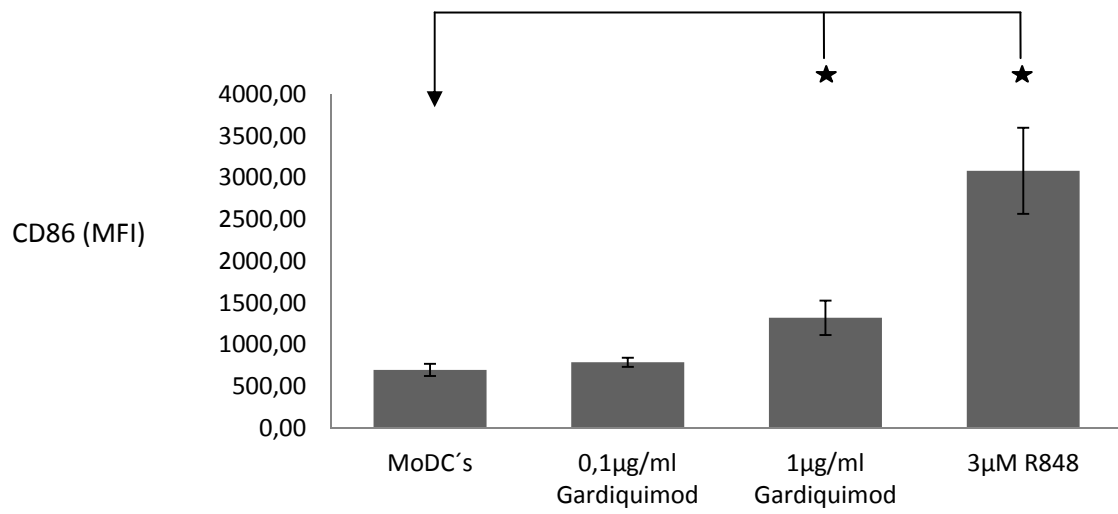
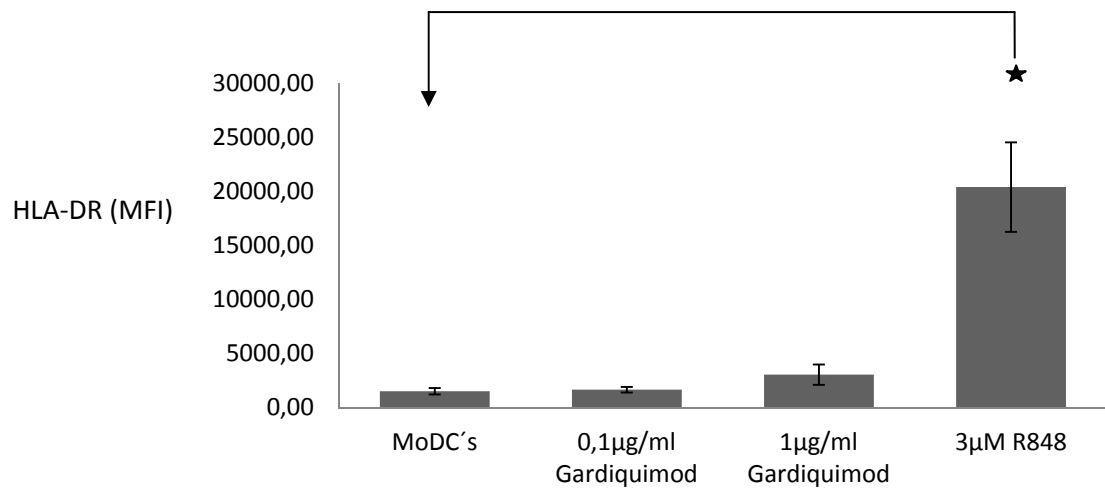
Die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD83 und CD86 wurden von den R848-DC's in signifikant höheren Mengen auf ihren Oberflächen exprimiert als bei den konventionellen MoDC's. Ebenso wurde HLA-DR in signifikant größeren Mengen auf den Oberflächen der R848-DC's präsentiert als bei der Kontrolle (MoDC's).

Die Gardiquimod-DC's exprimierten auf ihren Oberflächen nur mittelmäßige Mengen an CD40, CD83, CD86 und HLA-DR.

Außerdem wurden die Expressionen von BDCA-1, BDCA-2, BDCA-4 untersucht, bei denen sich aber keine Unterschiede zwischen den vier Gruppen nachweisen ließ. BDCA-2 und BDCA-4 werden vor allem von pDC's exprimiert; BDCA-1 vor allem von mDC's. Diese Untersuchungen wurden angeschlossen, um eine eventuelle Aussage über die Differenzierungsrichtung der R848-DC's machen zu können, was aber nicht möglich war.

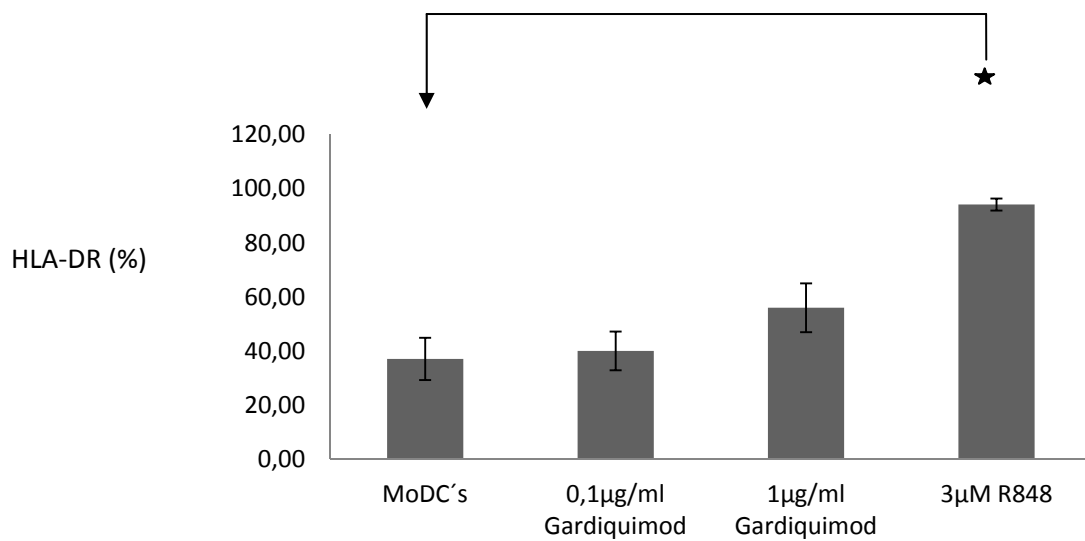
Ebenso wurde die Expression von CD25 (α-Kette des IL-2 Rezeptors) untersucht, um eine Aussage über eine mögliche Differenzierung der R848-DC's zu regulatorischen DC's zu machen; es ließen sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen nachweisen.

**A****B**

**C****D**



E



**Abb. 3.3.1.2: Die Expression kostimulatorischer Moleküle und HLA-DR der R848-DC's im Vergleich zu der Stimulation mit Gardiquimod. R848 blockiert nicht die Differenzierung und Reifung der DC's. Es entsteht eine andere Zellpopulation. Graphische Darstellung der z.T. beispielhaft dargestellten FACS-Analysen.**

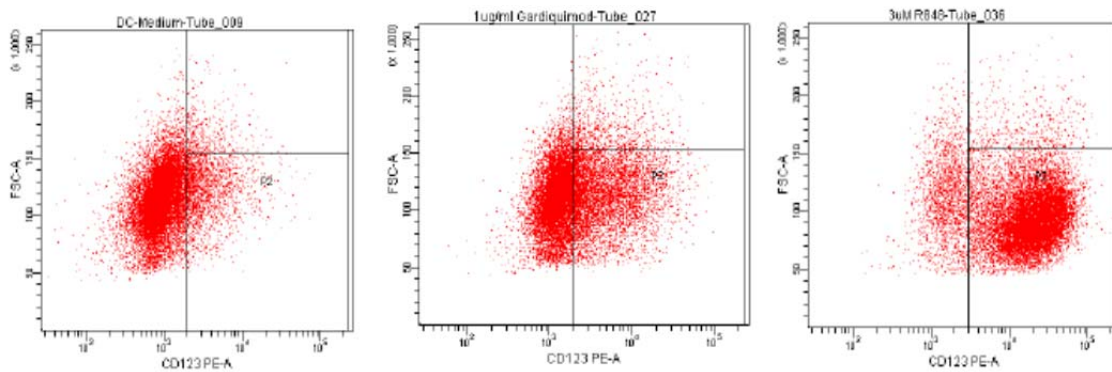
**A** CD40-Expression (MFI), **B** CD83-Expression (MFI), **C** CD86-Expression (MFI), **D** HLA-DR-Expression (MFI) und **E** HLA-DR-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3 µM R848 oder 0,1 – 1 µg/ml (0,319 – 3,19 µM) Gardiquimod über 5 Tage.

Mittelwerte ± stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen n = 6.

★  $p < 0,05$  versus MoDC's (Kontroll-DC's) (*two-tailed t-test*).

### 3.3.2 R848-DC's exprimieren CD123

**A**

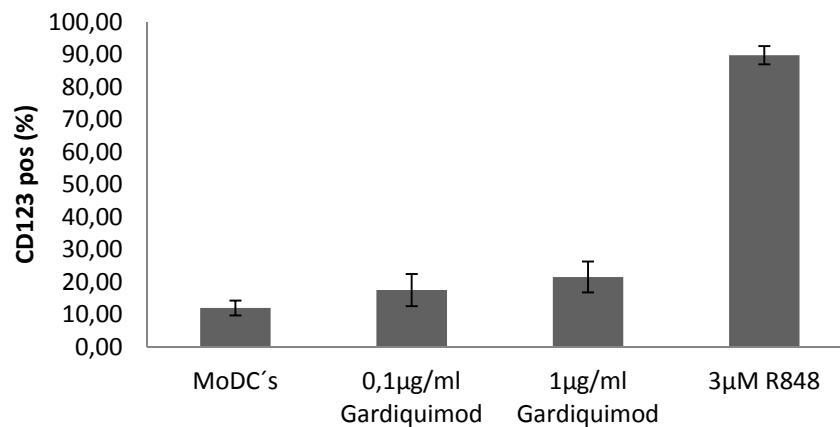


**Abb. 3.3.2.1: R848-DC's exprimieren CD123. FACS-Analyse eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3 µM R848 oder 1 µg/ml (3,19 µM) Gardiquimod über 5 Tage.**

**A** Färbung der MoDC's, der 1 µg/ml Gardiquimod-DC's und der 3 µM R848-DC's mit PE anti-human CD123.

Wie schon bei den vorangegangenen Experimenten unterschieden sich die Gardiquimod-DC's in ihrem Expressionsmuster nicht signifikant von dem der MoDC's. Anders verhielten sich die R848-DC's.

R848-DC's exprimierten, im Gegensatz zu konventionellen MoDC's und den Gardiquimod-DC's, in hohem Maße die  $\alpha$ -Kette des IL-3 Rezeptors (CD123), welche eigentlich ein typischer Oberflächenmarker der pDC's ist.



**Abb. 3.3.1.2: R848-DC's exprimieren CD123. Graphische Darstellung der z.T. beispielhaft dargestellten FACS-Analysen.**

**A** CD123-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3 µM R848 oder 0,1 – 1 µg/ml (0,319 – 3,19 µM) Gardiquimod über 5 Tage.

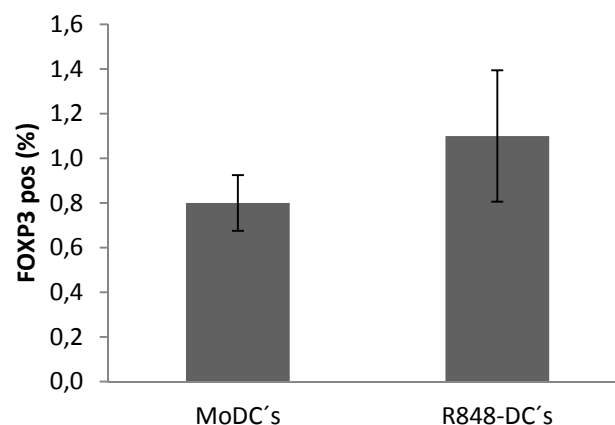
Mittelwerte ± stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen n = 6.

### 3.4 Die Expression von FOXP3 und CD122

#### 3.4.1 Expression von FOXP3

Auch bei den zwei folgenden Versuchsreihen wurden die zuvor separierten Monozyten mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 bzw. bei dem Nachweis der CD122-Expression zusätzlich noch die nur mit R848 stimulierten und unstimulierten Monozyten, für 5 Tage kultiviert und anschließend angefärbt.

Zusätzlich zu den Oberflächenmolekülen CD14 und CD1a wurden die Zellen noch mit dem intrazellulären Antikörper FOXP3 angefärbt, um weitere Charakteristika der R848-DC's zu erfassen.



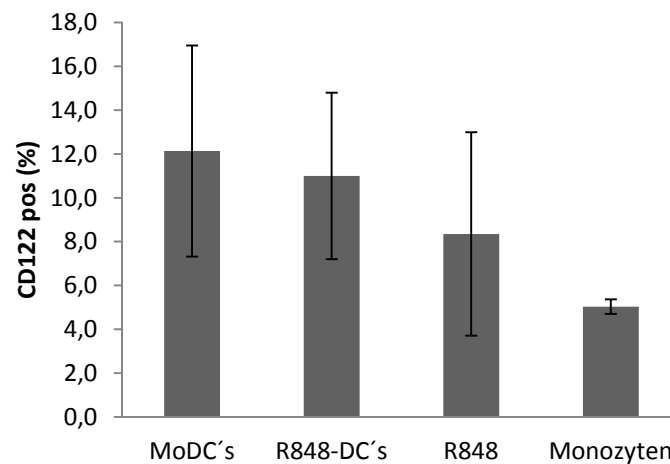
**Abb. 3.4.1.1: Die FOXP3-Expression der MoDC's und der R848-DC's im Vergleich. R848 verändert nicht die intrazelluläre FOXP3-Expression. Graphische Darstellung.**

FOXP3-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848.

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen n = 3.

### 3.4.2 Expression von CD122

Mit dieser Analyse sollte untersucht werden, ob es sich bei den von R848-DC's exprimierten IL-2 Rezeptoren um komplette, funktionsfähige Rezeptoren handelte.



**Abb. 3.4.2.1: Die CD122-Expression der R848-DC's im Vergleich. R848 verändert nicht die CD122-Expression. Graphische Darstellung.**

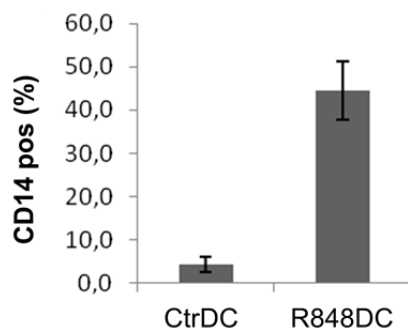
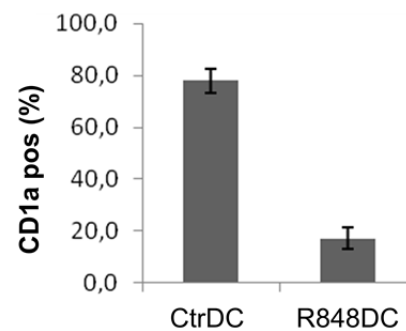
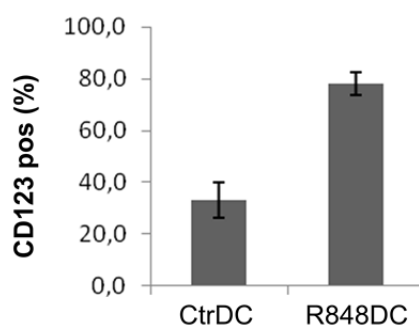
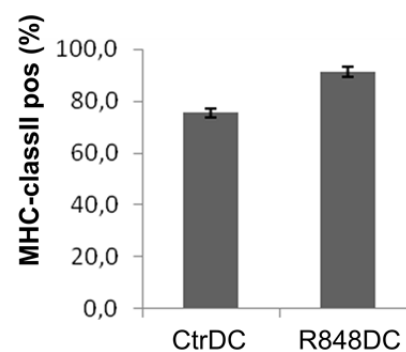
CD122-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 oder nur mit R848 bzw. ganz ohne Stimuli (Monozyten).

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen n = 4.

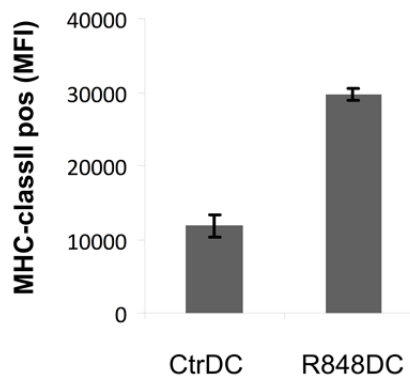
Bei der CD122-Expression ( $\beta$ -Kette des IL-2 Rezeptors) konnten zwischen den MoDC's, den R848-DC's sowie bei nur mit R848 stimulierten Monozyten und unstimulierten Monozyten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

### 3.5 R848-DC's zeigen auch nach dem Entfernen des Stimulators R848 einen stabilen Phänotyp

Das dreimalige Waschen der mit 1000 IU/ml GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 stimulierten Zellen an Tag 3 hatte den Zweck, den TLR7/8-Liganden R848 aus der Umgebung der Zellen zu entfernen. Nun wurde die Stabilität der bereits differenzierten Monozyten nach weiteren 3 Tagen in Kultur anhand der Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle überprüft. Dazu wurden die Zellen wieder wie oben beschrieben mit Antikörpern gegen CD14, CD1a, HLA-DR und CD123 angefärbt.

**A****B****C****D**

E



**Abb. 3.5.1: Die Expression der Oberflächenmoleküle der R848-DC's im Vergleich. Graphische Darstellung der FACS-Analyse eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3 µM R848 für 3 Tage; danach dreimaliges Waschen der Zellen mit DC-Medium und anschließend wieder 3 Tage mit bzw. ohne GM-CSF und IL-4 in Kultur genommen.**

**A** CD14-Expression (%), **B** CD1a-Expression (%), **C** CD123-Expression (%), HLA-DR-Expression (MHC-II) (%) und **D** HLA-DR-Expression (MHC-II) (MFI) der isolierten Monozyten nach 6 Tagen.

Mittelwerte ± stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen n = 3.

Auch nach dem Entfernen des R848 zeigten die Zellen, was die Oberflächenexpression betraf, einen stabilen Phänotyp.

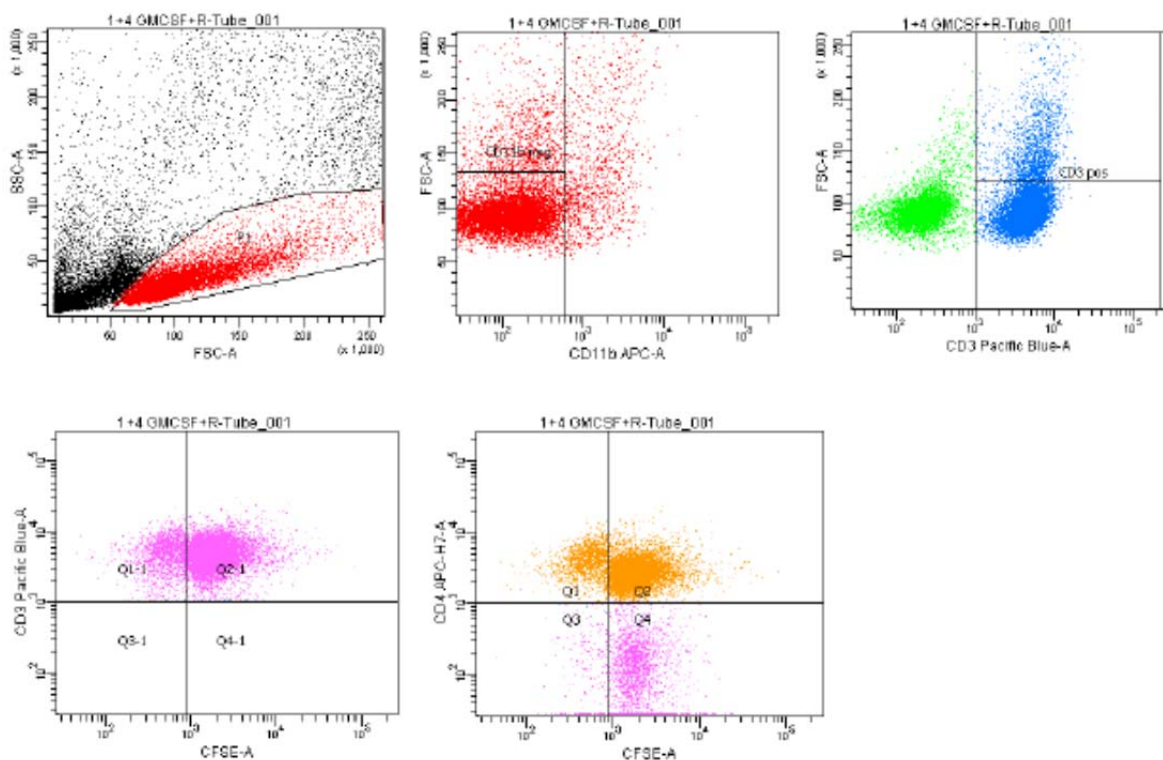
R848-DC's exprimierten weiterhin große Mengen an CD14, CD123 und HLA-DR (MHC-II) und geringen Mengen an CD1a.

### 3.6 R848-DC's induzieren eine bessere T-Zell-Proliferation als konventionelle MoDC's

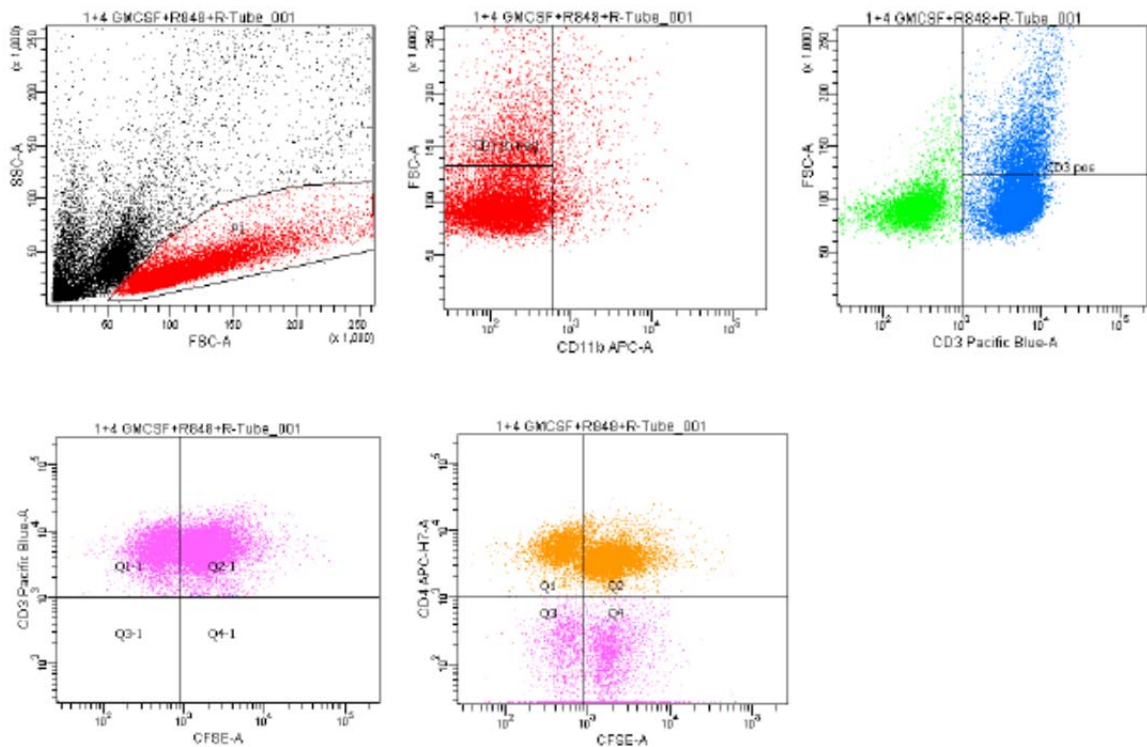
Um die T-Zell-Proliferationsrate unter Einwirkung der R848-DC's im Vergleich zu der der MoDC's zu testen, wurde eine MLR angesetzt. Dazu wurden zuerst die zuvor frisch separierten Monozyten mit 1000 IU/ml GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 3 Tage kultiviert. Dann wurden die MoDC's und die R848-DC's (Stimulatorzellen) geerntet und mit frisch isolierten, allogenen und mit 1  $\mu$ M CFDA-SE markierten PBMC's (Responderzellen) in der Ratio 1+4 in einer MLR für 5 – 7 Tage angesetzt. Als Positiv-Kontrolle dienten durch 0,5  $\mu$ g/ml anti-CD3/anti-CD28 aktivierte Responderzellen und als Negativ-Kontrolle dienten unstimulierte Responderzellen.

Die gesamten Zellen der jeweiligen MLR wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD11b, CD3 und CD4 angefärbt. Die CFSE-Färbung wurde im FITC-Kanal detektiert.

**A**





**B**

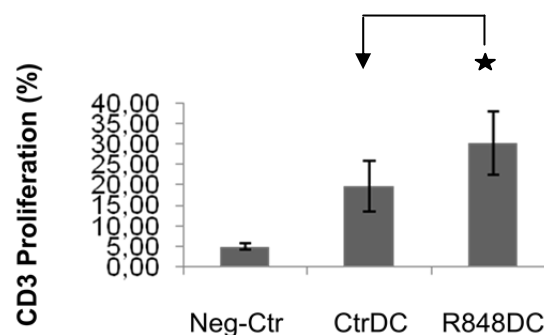
**Abb. 3.6.1: FACS-Analyse der T-Zell-Proliferation eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 über 3 Tage. Ansetzen der MLR mit den Stimulatorzellen und frisch isolierten, mit 1  $\mu$ M CFDA SE markierten, allogenen PBMC's (Responderzellen) in der Ratio 1 + 4 für 5 – 7 d.**

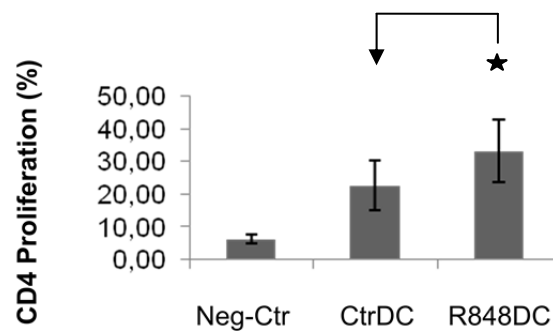
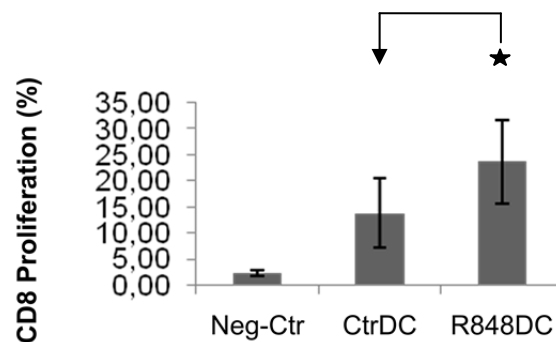
**A** Färbung der MoDC's (Stimulatorzellen) mit den markierten Responderzellen (Ratio 1+4) mit APC anti-human CD11b, APC-H7 anti-human CD4, Pacific Blue anti-human CD3; **B** Färbung der 3  $\mu$ M R848-DC's (Stimulatorzellen) mit den markierten Responderzellen (Ratio 1+4) s.o..

Um die MLR auszuwerten, wurden im ersten Schritt grob die Lymphozyten in der FSC/SSC-Darstellung ausgewählt (Abb. 3.6.1, **P1**), von diesen wurden nur die CD11b neg Zellen weiter dargestellt, da CD11b hauptsächlich von Granulozyten, Monozyten, einigen NK-Zellen exprimiert wird (Abb. 3.6.1, **CD11b neg**). Ausgehend von diesen Zellen wurden nun die CD3 pos T-Zellen ausgewählt (Abb. 3.6.1, **CD3 pos**), von denen wiederum nochmals die CD3 pos bzw. CD4 pos Zellen auf der Ordinate gegen die CFSE-Fluoreszenz auf der Abszisse dargestellt wurden um die gesamte T-Zellproliferation (Abb. 3.6.1, **Quadrant Q1-1**) bzw. die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen (Abb. 3.6.1, **Quadrant Q1**) und der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 3.6.1, **Quadrant Q3**) zu bestimmen.

Man kann deutlich bei den FACS-Analysen erkennen, dass die alloogenen T-Zellen, welche mit R848-DC's stimuliert wurden eine höhere Gesamt-T-Zellproliferation (CD3 pos T-Zellen) im Vergleich zu den CtrDC (MoDC's) aufweisen (Abb. 3.6.1 **Quadrant Q1-1**). Des Weiteren konnte auch eine höhere Proliferation der CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen (Abb. 3.6.1 **Quadrant Q1**), sowie der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 3.6.1 **Quadrant Q3**) festgestellt werden.

**A**



**B****C**

**Abb. 3.6.2: R848-DC's induzieren eine bessere T-Zell-Proliferation als MoDC's. Graphische Darstellung der z.T. beispielhaft dargestellten FACS-Analysen.**

**A** Relative CD3- (%), **B** CD4- (%) und **C** CD8-Proliferation (%) der Responderzellen induziert durch CtrDC (MoDC's) und R848-DC's über 5 – 7 Tage. Als Negativ-Kontrolle dienten unstimulierte Responderzellen.

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen  $n = 5$ .

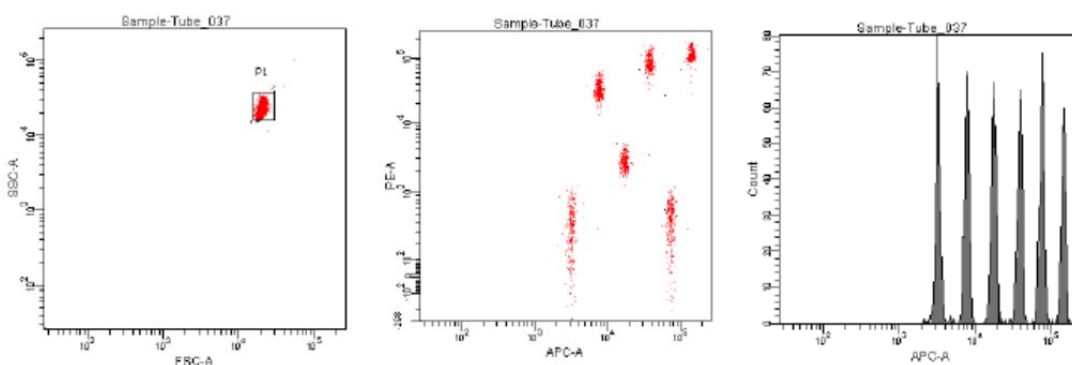
★  $p < 0,05$  versus MoDC's (CtrDC's) (*two-tailed t-test*).

### 3.7 R848-DC's produzieren verschiedene Zytokine mit immunregulatorischen Funktionen

Am Ende der Untersuchungen wurde die Bestimmung der Zytokinproduktion der R848-DC's durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob die R848-DC's im Vergleich zu den konventionellen MoDC's nach Restimulation mit LPS (TLR4-Ligand) bzw. CpG 2006 (TLR9-Ligand, B-Typ) ein anderes Zytokinprofil sezernieren.

Um die Überstände zur Zytokinbestimmung mittels CBA zu gewinnen, wurden Monozyten für 3 Tage mit 1000 IU/ml GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 stimuliert. Anschließend wurde durch dreimaliges Waschen der TLR7/8-Ligand R848 aus den Vertiefungen entfernt. Die schon differenzierten Zellen wurden nach 12h bzw. 72h Ruhen mit 2  $\mu$ g/ml LPS bzw. 3  $\mu$ g/ml CpG 2006 (TLR9-Ligand, B-Typ) für jeweils 24h restimuliert. Danach wurden die Überstände abgenommen und mittels CBA analysiert.

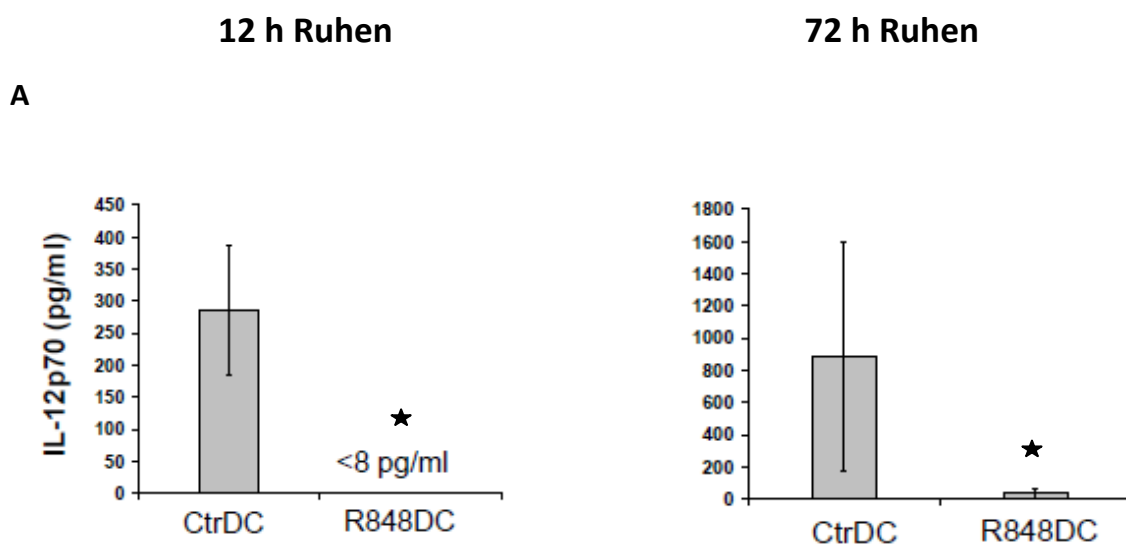
Ein exemplarisches Beispiel einer CBA-Analyse ist anschließend dargestellt.

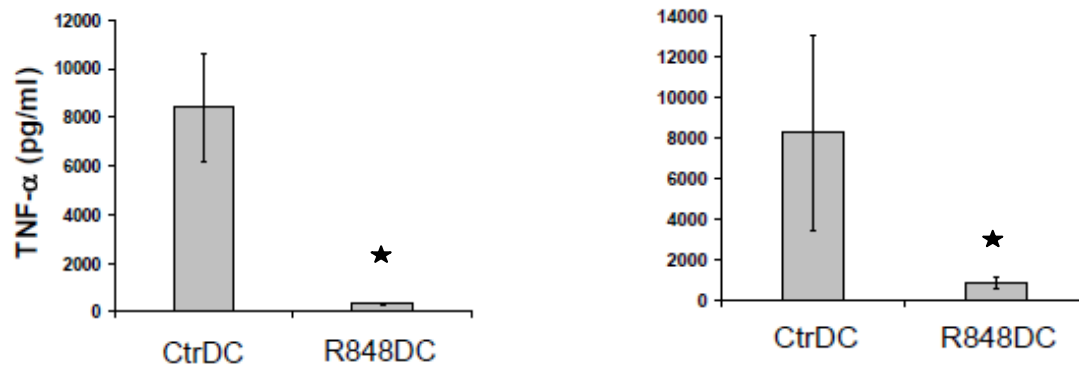
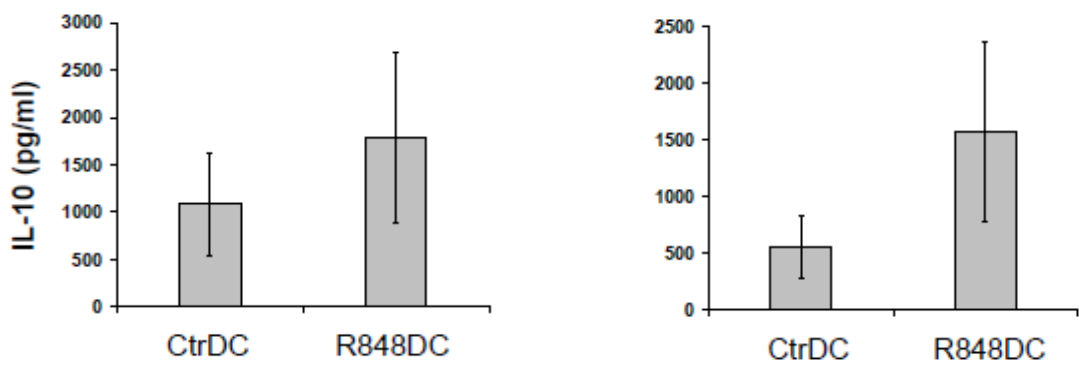
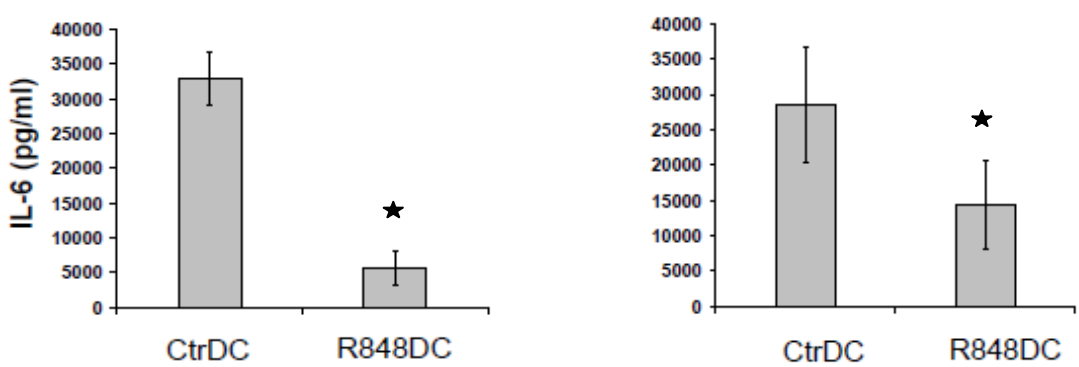


**Abb. 3.7.1: R848-DC's produzieren verschiedene Zytokine mit immunregulatorischen Funktionen. Beispielhafte Darstellung einer CBA FACS-Analyse.**

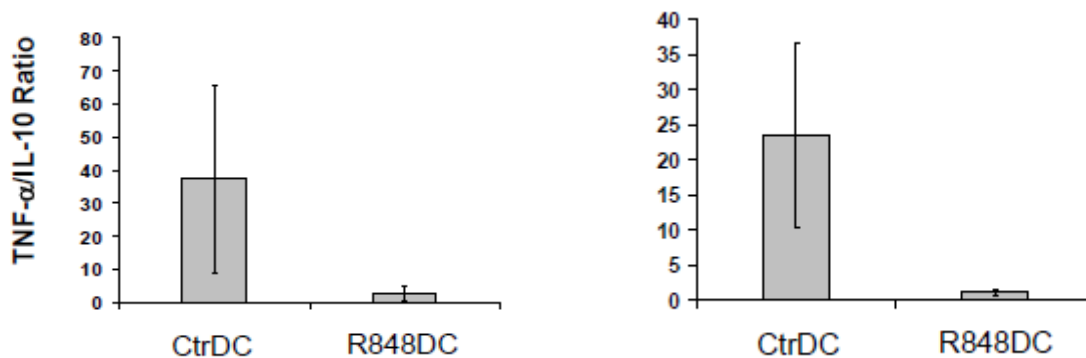
Nach der Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator wurden die Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 für 3 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen der Zellen mit DC-Medium und dann wurden die Zellen nach 12h bzw. 72h Ruhen mit 2  $\mu$ g/ml LPS bzw. 3  $\mu$ g/ml CpG 2006 für jeweils 24h restimuliert.

Um etwaige direkte Beeinflussungen von R848 in der Kultur auszuschließen, wurde R848 durch mehrmaliges Waschen entfernt und Ruhezeiten von 12h und 72h vor der Restimulation mit LPS bzw. CpG 2006 eingehalten.



**B****C****D**

E



**Abb. 3.7.2:** R848-DC's produzieren nach Restimulation mit LPS verschiedene Zytokine mit immunregulatorischen Funktionen. Graphische Darstellung der z.T. beispielhaft dargestellten CBA-Analysen.

**A** IL-12p70-Produktion (pg/ml); **B** TNF- $\alpha$ -Produktion (pg/ml); **C** IL-10-Produktion (pg/ml); **D** IL-6-Produktion (pg/ml) und **E** Verhältnis TNF- $\alpha$  zu IL-10 nach 12 bzw. 72 h Ruhen und folgender Restimulation der CtrDC (MoDC's) und der R848-DC's mit 2  $\mu$ g/ml LPS.

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen  $n = 4$ .

★  $p < 0,05$  versus CtrDC's (MoDC's) (*friedman test*).

Auf die Darstellung der Daten der MoDC's und der R848-DC's nach der Restimulation mit CpG 2006 wurde aus Übersichtsgründen verzichtet.

Die Analysen ergaben, dass R848-DC's, im Vergleich zu MoDC's, nach Restimulation mit LPS oder CpG 2006 geringere Mengen der proinflammatorischen Zytokine IL-12p70, TNF- $\alpha$  und IL-6 produzierten.

Im Gegensatz dazu war die Produktion von immunsuppressivem IL-10 bei den R848-DC's nach Restimulation mit LPS bzw. CpG 2006 leicht erhöht.

Bei der Produktion von IL-8 und IL-1 $\beta$  waren keine Unterschiede zwischen den MoDC's und den R848-DC's festzustellen.

Die Analyse des TNF- $\alpha$ /IL-10 Verhältnisses zeigte eine Verschiebung der Produktion des proinflammatorischen TNF- $\alpha$  zugunsten der des immunregulatorischen IL-10 bei den R848-DC's im Vergleich zu den konventionellen MoDC's nach der Restimulation mit LPS bzw. CpG 2006.



## 4 Diskussion

Resiquimod (R848) als synthetischer TLR7/8-Ligand stellt einen neuartigen Immunmodulator dar, dessen Effekte auf die *in vitro* generierten MoDC's erst teilweise verstanden sind.

Es liegen nur wenige Studien darüber vor, die die permanente Stimulation von *in vitro* generierten MoDC's mit dem synthetischen TLR7/8-Liganden R848 untersucht haben (112, 117-119).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels FACS-Analyse die Wirkungen verschiedener TLR7- und TLR7/8-Liganden auf die Differenzierung und Reifung der aus Monozyten generierten DC's untersucht. Des Weiteren wurden unterschiedliche inhibitorische Oligonukleotide (iODN's) eingesetzt, um den *Toll-like* Rezeptor zu identifizieren, durch den die Modulation der MoDC's hervorgerufen wird. Zu klären war außerdem, ob die permanente Präsenz des TLR7/8-Liganden R848 Einfluss auf die Stabilität der neu entstandenen Zellpopulation hat. Anschließend wurde die neu entstandene Zellpopulation noch auf ihre Fähigkeit hin untersucht, nach Restimulation verschiedene Zytokine zu produzieren und allogene T-Zellen zur Proliferation anzuregen.

Aus dem Blut verschiedener Spender wurden Monozyten separiert und anschließend, in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen (3  $\mu\text{M}$ , 2,25  $\mu\text{M}$ , 1,5  $\mu\text{M}$ , 750 nM und 300 nM) an R848, differenziert. Die neu entstandenen DC's wurden mittels FACS-Analyse auf ihre Expression der Oberflächenmoleküle CD14 und CD1a hin untersucht.

CD14 gilt als Oberflächenmarker für Monozyten und es dient u.a. als LPS-Rezeptor. Das Oberflächenmolekül CD1a findet man vor allem auf DC's.

Ab einer Stimulationskonzentration von 1,5  $\mu\text{M}$  R848 konnten deutliche Effekte beobachtet werden. Es zeigte sich, dass R848 dosisabhängig eine Hemmung von CD1a und eine Persistenz von CD14 bewirkte. So kann angenommen werden, dass es sich bei der neu entstanden Zellpopulation (im Weiteren R848-DC's genannt) nicht mehr um konventionelle MoDC's handelt, sondern um eine distinkte dendritische Zellpopulation, die ein modifiziertes Oberflächenexpressionsmuster aufweist.

#### **4.1 Expression der T-Zell kostimulatorischen Moleküle CD40, CD83, CD86, HLA-DR und CD123**

Mittels weiterer FACS-Analysen wurden die R848-DC's und die konventionellen MoDC's zum Vergleich auf ihr Oberflächenexpressionsmuster untersucht.

Das Oberflächenmolekül HLA-DR dient der Antigenpräsentation. CD40 stellt den Rezeptor für den CD40-Liganden der T-Zellen dar und fördert so das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen sowie die Zytokinproduktion bei Makrophagen und dendritischen Zellen. CD83 wird von DC's und einigen B-Zellen exprimiert und dient als Aktivierungsmarker für DC's. CD86 findet man primär auf der Oberfläche von Monozyten, aktivierten APC's, insbesondere auf DC's (83-84). Außerdem stellt das kostimulatorische Molekül CD86 einen Bestandteil des sog. B7-Komplexes (CD80/86) dar, welches mit dem CD28-Molekül der T-Zellen interagiert. Aus diesem Grund wird CD86 u.a. als wichtigstes Molekül für die Auslösung von T-Zell-Antworten angesehen (76-77).

Die Reifungsmarker HLA-DR, CD40 und CD86 wurden von R848-DC's in höherem Maße exprimiert, was für einen höheren Ausreifungsgrad dieser Zellpopulation im Vergleich zu

konventionellen MoDC's spricht. Die vermehrte Expression von CD83, das, wie bereits erwähnt, als Aktivierungsmarker von dendritischen Zellen gilt (85), spricht für einen erhöhten Aktivierungsgrad der R848-DC's im Vergleich zu den MoDC's.

Auch Assier et al. untersuchten die Wirkung von R848 auf MoDC's (112). Sie kamen zu dem Schluss, dass R848 die MoDC-Differenzierung und -Reifung hemmt, was mit unseren Untersuchungsergebnissen nicht bestätigt werden konnte. Vielmehr handelt es sich bei den R848-DC's um eine distinkte dendritische Zellpopulation aus anders differenzierten Zellen (modifiziertes Oberflächenexpressionsmuster) mit einem höheren Reifungs- und Aktivierungsgrad als der der MoDC's.

Eine Arbeitsgruppe, die die topische Applikation einer Creme mit dem Inhaltsstoff R848 bei Menschen untersuchte, berichtete im Jahr 2003 von einem Rückgang der CD1a exprimierenden Zellen, aber einem Anstieg an HLA-DR exprimierenden Zellen (120). Dies stimmt mit denen im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten *in vitro* Versuche überein. Da die R848-Stimulation von MoDC's auch zu einer Reduktion der Endozytose führte, kann angenommen werden, dass diese Veränderung auch die Schlüsselfunktion der DC's (121) verändert.

R848 induzierte bei den R848-DC's die Expression von CD123 ( $\alpha$ -Kette des IL-3-Rezeptors), die auch nach dem Entfernen von R848 stabil blieb. MoDC's exprimierten nur geringe Mengen an CD123.

Das Vorkommen des Moleküls CD123 in hohem Ausmaß ist eigentlich nur den pDC's vorbehalten. So kann man annehmen, dass R848-DC's eine distinkte DC-Population darstellen, die auch Merkmale der pDC's aufweisen.

## 4.2 TLR8 als Vermittler der immunmodulatorischen Wirkung von R848 auf MoDC's

Um den TLR zu identifizieren, der die Modulation der Differenzierung und Reifung bei den R848-DC's hervorruft, wurden zuerst weitere Experimente mit spezifischen TLR7-Liganden angeschlossen.

So wurden MoDC's mit verschiedenen Gardiquimod-Konzentrationen (spezifischer TLR7-Ligand) stimuliert. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Differenzierung und Reifung der Zellen im Vergleich zu den MoDC's. Die Gardiquimod-DC's exprimierten auf ihren Oberflächen nur mittelmäßige Mengen an CD40, CD83, CD86 und HLA-DR. Dies führt zu dem Schluss, dass der R848-Effekt auf die Reifung der DC's nicht durch eine TLR7/8 Stimulation hervorgerufen wird, sondern dass die Stimulation des TLR8 eine wesentliche Rolle spielt.

Um den Verdacht zu verifizieren, wurden anschließend drei verschiedene, spezifische inhibitorische ODN's eingesetzt. Es wurde ein TLR7/8/9-Inhibitor (iODN 2088), ein TLR 7/8-Inhibitor (iODN 20959) und ein TLR7-Inhibitor (iODN 20958) verwendet.

Die R848-Effekte auf die CD1a und die CD14 Expression wurden in der Gegenwart der TLR8 inhibierenden iODN 2088 und iODN 20959 antagonisiert. Im Gegensatz dazu wurden die R848-Effekte auf die MoDC-Differenzierung in Gegenwart von iODN 20958, welches nur TLR7 inhibiert, nicht beeinflusst. Es konnte also bewiesen werden, dass R848 die Differenzierung und Reifung der MoDC's hauptsächlich über TLR8 moduliert.

Die Differenzierung und Reifung der R848-DC's, erkennbar an den exprimierten kostimulatorischen Molekülen und am exprimierten HLA-DR, war zum Teil aufgehoben wenn eine TLR8-Stimulation fehlte. So kann man annehmen, dass die DC-Reifung vorrangig, aber nicht ausschließlich, durch TLR8 vermittelt wurde.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass für die Entstehung der R848-DC's unbedingt eine Kostimulation der Monozyten mit GM-CSF/IL-4 zusätzlich zu R848 vorhanden sein muss. Nur R848 differenzierte die Monozyten nicht zu DC's aus.

Außerdem sollte der Einfluss der permanenten Präsenz des TLR7/8-Liganden R848 auf die Stabilität der neu entstandenen Zellpopulation untersucht werden. Dazu wurden die mit und ohne R848 stimulierten MoDC's am dritten Tag der Stimulation dreimal gewaschen. Somit wurde R848 aus der Umgebung der Zellen entfernt. Anschließend wurden die bereits differenzierten MoDC's nach weiteren 3 Tagen Inkubation geerntet und mittels FACS-Analysen auf ihr Oberflächenexpressionsmuster untersucht.

Die R848-DC's zeigten auch nach längerem Entfernen von R848 einen stabilen Phänotyp. Dieses Erkenntnis kann in zukünftigen klinischen Therapien von Nutzen sein, da dadurch die Behandlungsintervalle gegebenenfalls verlängert werden könnten.

### **4.3 Induktion der allogenen T-Zell-Proliferation durch R848-DC's**

Um die funktionellen Eigenschaften und die Fähigkeit der Proliferationsanregung der T-Zellen durch die neu entstandenen R848-DC's zu erfassen, wurden MLR's angesetzt. Dazu wurden die mit CFSE-markierten PBMC's (Responderzellen) mit den allogenen MoDC's bzw. R848-DC's (Stimulatorzellen) in einem Stimulator-Responder-Verhältnis von 1:5 gemischt, kultiviert und anschließend die T-Zell-Proliferation mittels FACS-Analyse ausgewertet.

Die CD3<sup>+</sup> T-Zellen zeigten insgesamt eine stärkere Proliferation im Vergleich zu den mit MoDC's stimulierten PBMC's. Nach der Stimulation mit den R848-DC's zeigten vor allem die CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine stärkere Proliferation.

Es existieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die auch T-Helferzellen genannt werden, da sie wichtige Funktionen bei der T-B-Stimulation erfüllen. Diese T<sub>H</sub>-Zellen produzieren selbst oder induzieren die Produktion von verschiedenen Interleukinen, die wiederum regulierende Wirkung auf andere Lymphozyten ausüben.

Die Ergebnisse der T-Zellproliferationstests bestätigen die Annahme, dass es sich bei den R848-DC's um eine funktionell reifere Zellpopulation mit höchstwahrscheinlich auch regulatorischen Eigenschaften handelt.

Da R848-DC's konstant eine signifikant höhere T-Zell-Proliferation induzierten, ist anzunehmen, dass R848 die Differenzierung von funktionell aktiven DC's nicht inhibiert sondern fördert. Da diese Experimente mit einem Gemisch aus naiven und Gedächtnis T-Zellen durchgeführt wurden, sollten weitere Versuche folgen, in denen naive  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen als Responderzellen eingesetzt werden, um deren Proliferation unter R848-Wirkung zu erfassen, da die Induktion der Proliferation naiver  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen ein Hauptmerkmal funktionell aktiver DC's ist. Des Weiteren sollte die funktionelle Polarisierung mit R848-DC's stimulierten  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen überprüft werden, indem man deren Zytokinproduktion analysiert.

#### 4.4 Zytokinproduktion der R848-DC's

Die R848-DC's sezernierten im Vergleich zu MoDC's, nach einer Restimulation mit LPS bzw. CpG 2006, weniger proinflammatorische Zytokine (IL-12p70, TNF- $\alpha$  und IL-6) und mehr immunsuppressives IL-10.

Die reduzierte Produktion von IL-6 kann zu einer verringerten Interaktion des angeborenen Immunsystems mit dem erworbenen Immunsystem führen (92).

Durch die reduzierte Produktion von IL-12p70 findet keine Differenzierung von  $T_{H1}$ -Zellen aus naiven T-Zellen statt (68), und NK-Zellen und  $CD8^+$ -CTL weisen eine geringere Aktivität auf als bei der Interaktion mit konventionellen MoDC's.

Die vermehrte Produktion von IL-10 kann zu einer vermehrten Differenzierung von  $T_{H2}$ -Zellen aus naiven T-Zellen, einer Verminderung der DC-Reifung durch Hemmung der Translokation von MHC-II-Peptid-Komplexen auf die Zelloberfläche (31, 68) und zu einer gesteigerten Bildung von regulatorischen T-Zellen führen. Außerdem wird die Bildung von IL-6 sowie TNF gehemmt und somit eine T-Zellaktivierung direkt unterdrückt.

Die Analyse des TNF- $\alpha$ /IL-10 Verhältnisses zeigt eine Verschiebung der Produktion des proinflammatorischen TNF- $\alpha$  zugunsten der des immunregulatorischen IL-10 bei den R848-DC's im Vergleich zu den konventionellen MoDC's nach der Restimulation mit LPS bzw. CpG 2006.

Aus diesem Zytokinprofil kann geschlossen werden, dass sich die R848-DC's an der antiinflammatorischen Regulation der Immunantwort beteiligen und eine Verlagerung dessen auf eine  $T_{H2}$ -Zell-dominierte Reaktion bewirken, was den Organismus vor einer übersteigerten zellvermittelten Immunreaktion schützen kann.

Somit liegt die Annahme nahe, dass es sich bei den R848-DC's um eine distinkte Zellpopulation dendritischer Zellen handelt, die einen höheren Ausreifungsgrad und Aktivierungsgrad als der der MoDC's aufweisen, einige Oberflächenmerkmale mit denen der pDC's teilen und auch regulatorische Eigenschaften besitzen.

So führt eine TLR8-Stimulation, im Gegensatz zu einer TLR7-Stimulation, nicht nur quantitativ bei MoDC's zu einer veränderten Zytokinproduktion und Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, sondern hat auch qualitative Auswirkungen auf deren Funktion.

## 5 Zusammenfassung

Dendritische Zellen stellen eine wichtige Gruppe von APC's dar, die sowohl das angeborene wie auch das erworbene Immunsystem beeinflussen. Synthetische Imidazoquinolinderivate, zu denen auch R848 zählt, werden in klinischen Untersuchungen auf ihre Wirksamkeit hin getestet, die Immunantwort zu beeinflussen.

Von R848 ist bekannt, dass es die MoDC-Differenzierung und -Reifung beeinflusst, aber die Rolle der vermittelnden TLR's (TLR7 und TLR8) ist noch nicht genauer untersucht worden.

Um den Einfluss von TLR7 und TLR8 auf die Differenzierung und Reifung konventioneller MoDC's zu untersuchen wurden MoDC's mit dem TLR7/8-Liganden R848, mit spezifischen TLR7-Liganden (Gardiquimod und Loxoribine) und mit verschiedenen inhibitorischen ODN's (iODN 2088, iODN 20958 und iODN 20959) behandelt.

*In vitro* generierte MoDC's, die mit dem synthetischen Imidazoquinolinderivat R848 stimuliert wurden, zeigten dosisabhängig eine modifizierte DC-Differenzierung. Bei den spezifischen TLR7-Liganden hingegen konnten keine Wirkungen, die sich in der analysierten CD14- und CD1a-Expression bemerkbar machten, nachgewiesen werden.

Die Kostimulation mit den verschiedenen iODN's bestätigte die Annahme, dass die veränderte MoDC-Differenzierung und -Reifung auf einer TLR8-Aktivierung beruht, da nur die TLR8 inhibitorischen iODN's 2088 und 20959 die R848-Effekte aufheben konnten.

Des Weiteren exprimierten R848-DC's einen höheren Anteil der T-Zell kostimulatorischen Moleküle CD40, CD83, CD86 und HLA-DR im Vergleich zu konventionellen MoDC's und mit TLR7-Liganden stimulierten MoDC's.

R848-DC's führten zu einer stärkeren allophenen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellproliferation im Vergleich zu konventionellen MoDC's.

R848-DC's produzierten nach einer weiteren Stimulation ein immunregulatorisches Zytokinprofil.



So stellen R848-DC's möglicherweise eine distinkte dendritische Zellpopulation dar, die auch regulatorische Funktionen ausüben können.

Die selektive Stimulation von MoDC's in der Gegenwart von GM-CSF/IL-4 über TLR8 führt zu einer Veränderung der Immunantwort auf zwei Ebenen; zum einen durch die Modifizierung der DC-Differenzierung, und zum anderen durch die gesteigerte Reifung und möglicherweise die Ausübung einer regulatorischen Funktion dieser Zellen.

Diese Ergebnisse liefern neue Erkenntnisse über die Rolle des TLR8 und können außerdem dazu beitragen in Zukunft TLR-gestützte Immuntherapien zu entwickeln.

## 6 Summary

Dendritic cells represent important APC's modulating the innate and adaptive immune system. Synthetic imidazoquinoline compounds, like R848, undergoing clinical testing to investigate their efficacy to modify the immune response.

R848 is known to modulate MoDC differentiation and maturation, but the role of TLR7 and TLR8 is not yet investigated.

In order to analyse the contribution of TLR7 and TLR8 on differentiation and maturation of conventional moDC's, they were treated with the TLR7/8 ligand R848, with selective TLR7 ligands (gardiquimod and loxoribine) and with several inhibitory ODN's (iODN 22088, iODN 20958 and iODN 20959).

*In vitro* generated moDC's stimulated with the synthetic imidazoquinoline compound R848 lead to a modified DC differentiation in a dose-dependent manner. In contrast selective TLR7 ligands had no effect on moDC differentiation as analysed by CD14 and CD1a expression.

Costimulation with several iODN's confirmed the assumption that the modified moDC differentiation and maturation is based on the activation of TLR8, because R848 effects were only antagonized in the presence of TLR8 iODN's 2088 and 20959.

Direct comparison of R848-DC's with conventional moDC's and TLR7-stimulated DC's revealed significantly higher expression of T-cell costimulatory molecules CD40, CD83, CD86 and HLA-DR.

Accordingly R848-DC's boosted significantly stronger allogeneic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell proliferation in comparison to conventional moDC's.

In addition R848-DC's exhibited after restimulation an immunoregulatory cytokine profile.

R848-DC's represent possibly a distinct dendritic cell population which can exert immunoregulatory functions.

The selective stimulation of moDC's in the presence of GM-CSF/IL-4 via TLR8 with R848 leads to an alteration of the immune response at two levels; firstly, by modifying DC differentiation, and secondly, by increasing DC maturation und promoting possibly more regulatory function of these cells.

These results give new insights into the distinct function of TLR8 and may be relevant to develop TLR-based immune therapies in the future.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Dr. Christian Hahn (2003). Die Rolle von IL-4 und IL-3 in Maus-Modellen für allergische Erkrankungen
2. Green, D. R., Reed, J., C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312
3. Savill, J., Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**: 784-788
4. Lodoen, M., B., Lanier, L., L. (2005). Viral modulation of NK cell immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 59-69
5. Dr. Mathias Krummen (2006). Synergistische Aktivierung von dendritischen Zellen durch Kombination von TLR Liganden und Untersuchung von Dextran-basierenden Nanopartikeln als Carrier in der Immuntherapie.
6. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783
7. McInturff, J. E., Modlin, R. L., Kim, J. (2005). The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J. Invest. Dermatol.* **125**:1
8. Kaisho, T., Akira, S. (2006). Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**:979
9. Takeda, K., Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**:1
10. Akira, S. (2000). Toll-like receptors: lessons from knockout mice. *Biochem. Soc. Trans.* **28**:551
11. Moussian, B., Roth, S. (2005). Dorsoventral axis formation in the Drosophila embryo-shaping and transducing a morphogen gradient. *Curr. Biol.* **15**:R887
12. Royet, J., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. (2005). Sensing and signaling during infection in Drosophila. *Curr. Opin. Immunol.* **17**:11
13. Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* **430**:257

14. Kiyoshi, T., Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **Vol. 17**, No. 1, pp 1-14
15. Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M. Y., Van Huffel, C., McNally, O., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Du, X., Thompson, P., Chan, E. K., Ledesma, J., Roe, B., Clifton, S., Vogel, S. N., Beutler, B. (1998). Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* **24**:340
16. Netea, M. G., Ferwerda, G., van der Graaf, C. A., Van der Meer, J. W., Kullberg, B. J. (2006). Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. *Curr. Pharm. Des.* **12**:4195
17. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**:2085
18. Koedel, U., Angele, B., Rupprecht, T., Wagner, H., Roggenkamp, A., Pfister, H. W., Kirschning, C. J. (2003). Toll-Like Receptor 2 Participates in Mediation of Immune Response in Experimental Pneumococcal Meningitis. *J. Immunol.* **170**:438
19. Wang, J., Shao, Y., Bennett, T. A., Shankar, R. A., Wightman, P. D., Reddy, L. G. (2006). The Functional Effects of Physical Interactions among Toll-like Receptors 7, 8, and 9. *J. Biol. Chem.* **281**:37427
20. Kang, S. S., Kauls, L. S., Gaspari, A. A. (2006). Toll-like receptors: applications to dermatologic disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* **54**:951
21. Dr. Nicole Fitzner (2006). Die Expression von funktionellen Toll-like Rezeptoren auf humanen Hautendothelzellen als essentieller Faktor in der Entzündungsreaktion.
22. Hemmi, H. et al. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88 signaling pathway. *Nat. Immunol.* **3 (2)**: 196-200
23. Jurk, M. et al. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R848. *Nat. Immunol.* **3 (6)**: 499

24. Caron, G. et al. (2005). Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* **175**, 1551
25. Lee, J. et al. (2002). Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100 (11)**: 6646-6651
26. Landy, M. and Baker, P. (1966). *J. Immunol.*, **97**, 670
27. Skidmore, B. et al. (1975). *J. Immunol.*, **114**, 770
28. Kawai, T., Akira, S. (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **17**:338
29. Kawai, T., Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**:816
30. Steinman, R. M., Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137**(5): 1142-62
31. Banchereau, J., Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**: 254-252
32. Bell, D., Young, J. W., Banchereau, J. (1999). Dendritic cells. *Adv. Immunol* **72**: 255-324
33. Hart, D. N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**: 3245-3287
34. Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 271-296
35. Grouard, G., Rissoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., Liu, Y. J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* **185**: 1101-1111
36. Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson P. A., Carballido, J., Picker, L. J., Lund-Johansen, F. (1997). Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 122551-12556
37. O'Doherty, U., Steinman, R. M., Peng, M., Cameron, P. U., Gezelter, S., Kopeloff, I., Swiggard, W. J., Pope, M., Bhardwaj, N. (1993). Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory

- dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J. Exp. Med.* **178**: 1067-1076
38. Strobl, H., Scheinecker, C., Riedl, E., Csmarits, B., Bello-Fernandez, C., Pickl, W. F., Majdic, O., Knapp, W. (1998). Identification of CD68<sup>+</sup>lin peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J. Immunol.* **161**: 740-748
  39. Banchereau, J. et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 767-811
  40. Palucka, K., Banchereau, J. (1999). Linking innate and adaptive immunity. *Nat. Med.* **5**: 868-870
  41. Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type I interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**: 1883-1837
  42. Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pietres, J., Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**: 782-787
  43. Shah, P. D. (1987). Dendritic cells but not macrophages are targets for immune regulation by natural killer cells. *Cell Immunol.* **104**: 440-445
  44. Geldhof, A. B., Moser, M., Lespagnard, L., Thielemanns, K., De Baetselier, P. (1998). Interleukin-12-activated natural killer cells recognize B7 costimulatory molecules on tumor cells and autologous dendritic cells. *Blood* **91**: 196-206
  45. Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* **188**: 373-386
  46. Power, C. A., Church, d. J., Meyer, A., Alouan, S., Proudfoot, A. E., Clark-Lewis, I., Sozzani, S., Mantovani, A., Wells, T. N. (1997). Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3 $\alpha$  from lung dendritic cells. *J. Exp. Med.* **186**: 825-835
  47. Greaves, D. R., Wang, W., Dairaghi, D. J., Dieu, M. C., Saint-Vis, B., Franz-Bacon, K., Rossi, D., Caux, C., Mc-Clanahan, T., Gordon, S., Zlotnik, A., Schall, T. J. (1997). CCR6, a chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory

- protein 3 $\alpha$  and is highly expressed on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **186**: 837-844
48. Mommaas, A. M., Mulder, A. A., Jordens, R., Out, C., Tan, M. C., Cresswell, P., Kluin, P. M., Koning, F. (1999). Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal / lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur. J. Immunol.* **29**: 571-580
  49. Engering, A. J., Cella, M., Fluitsma, D., Brockhaus, M., Hoefsmit, E. C., Lanzavecchia, A., Pieters, J. (1997). The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2417-2425
  50. Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., Nussenzweig, M. C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**: 151-155
  51. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**: 389-400
  52. Tan, M. C., Mommaas, A. M., Drijfhout, J. W., Jordens, R., Onderwater, J. J., Verwoerd, D., Mulder, A. A., van der Heiden, A. N., Scheidegger, D., Oomen, L. C., Ottenhoff, T. H., Tulp, A., Neefjes, J. J., Koning, F. (1997). Mannose receptor-mediated uptake of antigen strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2426-2435
  53. Reis e Sousa, C., Stahl, P. D., Austyn, J. M. (1993). Phagocytosis of antigen by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* **178**: 509-519
  54. Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., Guyre, P. M. (1996). Type I (CD 64) and type II (CD32) Fc  $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* **157**: 541-548
  55. Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., Steinman, R. M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* **178**: 479-488



56. Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S., Foti, M., Ricciardi-Castagnoli, P. (1999). Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol. Today* **20**: 200-203
57. Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via  $\alpha\text{v}\beta 5$  and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **188**: 1359-1368
58. Albert, M. L., Sauter, B., Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**: 86-89
59. Rubartelli, A., Poggi, A., Zocchi, M. R. (1997). The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the  $\alpha (v) \beta 3$  integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur. J. Immunol.* **27**: 1893-1900
60. Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J., Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* **185**: 317-328
61. Zhou, L. J., Tedder, T. F. (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol.* **154** (8): 3821-3835
62. Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte / macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J. Exp. Med.* **179**: 1109-1118
63. Inaba, K., Turley, S., Yamaide, F., Lyoda, T., Mahnke, K., Inaba, M., Pack, M., Subklewe, M., Sauter, B., Sheff, D., Albert, M., Bhardwaj, N., Mellman, I., Steinman, R. M. (1998). Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **188**: 2163-2173
64. Inaba, K., Pack, M., Inaba, M., Sakuta, H., Isdell, F., Steinman, R. M. (1997). High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J. Exp. Med.* **186**: 665-672

65. Kleijmeer, M. J., Ossevoort, M. A., van Veen, C. J., van Hellemond, J. J., Neefjes, J. J., Kast, W. M., Melief, C. J., Geuze, H. J. (1995). MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J. Immunol.* **154**: 5715-5724
66. Nijman, H. W., Kleijmeer, M. J., Ossevoort, M. A., Oortschot, V. M., Vierboom, M. P., van de Keur, M., Kenemana, P., Kast, W. M., Geuze, H. J., Melief, C. J. (1995). Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J. Exp. Med.* **182**: 163-174
67. Pierre, P., Turley, S. J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R. M., Mellman, I. (1997). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* **388**: 787-792
68. [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)
69. Sornasse, T., Flamand, V., De Becker, G., Bazin, H., Tielemanns, F., Thielemanns, K., Urbian, J., Leo, O., Moser, M. (1992). Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response in vivo. *J. Exp. Med.* **175**: 15-21
70. Inaba, K., Young, J. W., Steinman, R. M. (1987). Direct activation of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **166**: 182-194
71. Macatonia, S. E., Taylor, P. M., Knight, S. C., Askona, B. A. (1989). Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. *J. Exp. Med.* **169**: 1255-1264
72. Nair, S., Zhou, F., Reddy, R., Huang, L., Rouse, B. T. (1992). Soluble proteins delivered to dendritic cells via pH-sensitive liposomes induce primary cytotoxic T lymphocyte responses in vitro. *J. Exp. Med.* **175**: 609-612
73. Mehta-Damani, A., Markowitz, A. S., Engleman, E. G. (1994). Generation of antigen-specific CD8<sup>+</sup> CTLs from naive precursors. *J. Immunol.* **153**: 996-1003
74. Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M. (1998). Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag
75. Rescigno, M. C., Winzler, D., Delia, D., Mutini, C., Lutz, M., Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Dendritic cell maturation is required for initiation of the immune response. *J. Leukoc. Biol.* **61** (4): 415-421

76. Caux, C., Vanbervliet, B., Masacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L. L., Banchereau, J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **180**: 1841-1847
77. Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K. S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley P. S., Ikehara, S., Murramatsu, S., Hodes, R. J., Steinman, R. M. (1994). The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J. Exp. Med.* **180**: 1849-1860
78. Ridge, J. P., Di Rosa, F., Matzinger, P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4<sup>+</sup> T-helper and a t-killer cell. *Nature* **393**: 474-48
79. Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F., Heath, W. R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**: 478-480
80. Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40-L interactions. *Nature* **393**: 480-483
81. Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kotten, C., Durand, I., Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* **180**: 1263-1272
82. Barclay, N.A., Brown, M. H., Birkeland, M.L. et al., ed. (1997). The Leucocyte Antigen Facts Book. San Diego, CA: *Academic Press (Biology)*.
83. Schlossman, S. F., Boumsell, L., Gilks, W., et al. (1995). Leucocyte typing V: White cell differentiation antigens. *New York: Oxford University Press*.
84. Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., et al. (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* **366 (6450)**: 76-79
85. Dzionek, A., et al. (2000). BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4: Three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* **165**. 6035-6046
86. Grabbe, S., et al. (2000). Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol. Today* **21**:431-433
87. Shevach, E. M. (2001). Certified professionals: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T-cells. *J. Exp. Med.* **193**: F41-F46

88. Kishimoto,T., von dem Borne, A. E. G., Goyert, S. M., et al. (1997). Leucocyte typing VI: White cell differentiation antigens. *London: Garland Publishing.*
89. Hori, S., et al. (2003). *Science* **299**: 1057
90. Dinarello, C.A. (2005).Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J. Exp. Med.* **201**: 1355-1359
91. Rivest S. et al. (2000).How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **223 (1)**: 22-38
92. Jones, S.A. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: Defining a role for IL-6. *J. Immunol.* **175**:3463-3468
93. Heinrich, P.C. et al. (2003).Principles of Interleukin (IL)-6-type signaling and its regulation. *Biochem. J.* **374**: 1-20
94. Fischer, C. P. (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc. Immunol. Rev.* **12**: 6-33
95. Brat, D. J., Bellail, A. C., Van Meir, E. G. (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomangenesi and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology.* **7 (2)**: 122-133
96. Grütz, G. (2005). New sights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leuk. Biol.* **77**: 3-15
97. Segal, B. M., Klinman, D. M., Shevach, E., M. (1997). Microbial products induce autoimmune disease by an IL-12-dependent pathway. *J. Immunol.* **158 (11)**: 5087–5090
98. Hehlhans, T., Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor / tumor necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunol.***115**: 1-20
99. Schwartz, R., Dameshek, W. (1959). Drug – induced immunological tolerance. *Nature* **183**: 1682-1683
100. Schwartz, R., Dameshek, W. (1960). The effects of 6-mercaptopurine on homograft reactions. *J. Clin. Invest.* **39**: 952-958
101. Hackstein, H., Taner, T., Logar, A. J., Thompson, A. W. (2002). Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone-marrow derived dendritic cells. *Blood* **100**: 1084-1087

102. Hackstein, H., Taner, Zahorchak, A. F., Morelli, A. E., Logar, A. J., Gessner, A., Thompson, A. W. (2003). Rapamycin inhibits IL-4-induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood* **101**: 4457-4463
103. Turnquist, H. R., Cardinal, J., Macedo, C., Rosborough, B. R., Sumpter, T. L., Geller, D. A., Metes, D., Thompson, A. W. (2010). mTOR and GSK-3 shape the CD4<sup>+</sup> T-cell stimulatory and differentiation capacity of myeloid DCs after exposure to LPS. *Blood* **115**: 4758-4769
104. Hackstein, H., Morelli, A. E., Larregina, A. T., Ganster, R. W., Papworth, G. D., Logar, A. J., Watkins, S. C., Falo, L. D., Thompson, A. W. (2001). Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. *J. Immunol.* **166**: 7053-7062
105. Buckland, M., Jago, C., Fazekesova, H., George, A., Lechler, R., Lombardi, G. (2006). Aspirin modified dendritic cells are potent inducers of allo-specific regulatory T-cells. *Int. Immunopharmacol.* **6**: 1895-1901
106. Hackstein, H., Thompson, A. W. (2004). Dendritic cells emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 24-34
107. Turnquist, H. R., Fischer, R. T., Thompson, A. W. (2010). Pharmacological modification of dendritic cells to promote their tolerogenicity in transplantation. *Methods Mol. Biol.* **595**: 135-148
108. Schon, M. P., Schon, M. (2008). TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* **27**: 190-199
109. Miller, R. L., Meng, T. C., Tomai, M. A. (2008). The antiviral activity of Toll-like receptor 7 and 7/8 agonists. *Drug News Perspect* **21**:69-87
110. Tomai, M. A., Miller, R. L., Lipson, K. E., Kieper, W. C., Zarraga, I. E., Vasilakos, J. P. (2007). Resiquimod and other immune response modifiers as vaccine adjuvants. *Expert Rev.* **6**: 835-847
111. Szeimies, R. M., Bichel, J., Ortonne, J. P., Stockfleth, E., Lee, J., Meng, T. C. (2008). A phase II dose-ranging study of topical resiquimod to treat actinic keratosis. *Br. J. Dermatol.* **159**: 205-210

112. Assier, E., Marin-Esteban, V., Haziot, A., Maggi, E., Charron, D., Mooney, N. (2007). TLR7/8 agonists impair monocyte-derived dendritic cell differentiation and maturation. *J. Leuk. Biol.* **81**: 221-228
113. Larange, A., Antonios, D., Pallardy, M., Kerdine-Romer, S. (2009). TLR 7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *J. Leukoc. Biol.* **85**: 673-683
114. Lombardi, V., Van Overtvelt, L., Horiot, S., Miongeon, P. (2009). Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or ZTLR8 induce the sequential production of IL-10, IFN-gamma and IL-17 by naïve CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* **182**: 3372-3379
115. Gorden, K. B., Gorski, K. S., Gibson, S. J., Kedl, R. M., Kieper, W. C., Qiu, X., Tomai, M. A., Alkan, S. S., Vasilakos, J. P. (2005). Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J. Immunol.* **174**: 1259-1268
116. mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Nelli Baal (2007), Zelluläre Interaktionen während der plazentaren Vaskularisation: Modell der plazentaren Vaskulogenese unter besonderer Berücksichtigung der Rolle des Trophoblasten)
117. Ahonen, C. L., Gibson, S. J., Smith, R. M., Pederson, L. K., Lindh, J. M., Tomai, M. A., Vasilakos, J. P. (1999). Dendritic cell maturation and subsequent enhanced T-cell stimulation induced with the novel synthetic immune response modifier R-848. *Cell. Immunol.* **197**: 62-72
118. Gautier, G., Humbert, M., Deauvieau, F., Scuiller, M., Hiscott, J., Bates, E. E., Trinchieri, G., Caux, C., Garrone, P. (2005). A type I interferone autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **201**: 1435-1446
119. Fogel, M., Long, J. A., Thompson, P. J., Upham, J. W. (2002). Dendritic cell maturation and IL-12 synthesis induced by the synthetic immune-response modifier S-28463. *J. Leukoc. Biol.* **72**: 932-938
120. Sauder, D. N., Smith, M. H., Senta-McMillian, T., Sorta, I., Meng, T. C. (2003). Randomized, single-blind, placebo-controlled study of topical application of the immune response modulator resiquimod in healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**: 3846-3852

121. Trinchieri, G., Scott, P. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. *Res. Immunol.* **146**: 423-431

## 8 Abbildungsverzeichnis

**Abb. 1.1.1:**

Mechanismen des angeborenen und erworbenen Immunsystems.

**Abb. 1.2.3.1:**

Übersicht exogener TLR-Liganden im humanen und murinen System. Dargestellt sind zur Verdeutlichung der Vielfalt der Pathogenerkennung verschiedene exogene TLR-Liganden.

**Abb. 1.2.3.1.1:**

Strukturformel von R848.

**Abb. 1.2.3.2.1:**

Strukturformel vom Gardiquimod.

**Abb. 1.2.3.3.1:**

Strukturformel von Loxoribine.

**Abb. 1.2.3.5.1:**

Hauptsächliche Angriffspunkte und deren Auswirkungen hervorgerufen durch die verschiedenen CpG ODN's.

**Abb. 1.2.3.5.2:**

Die unterschiedlichen Basensequenzen der drei CpG ODN Klassen. Basen in Großbuchstaben dargestellt bezeichnen Phosphodiester und Basen in Kleinbuchstaben sind Phosphorothioate (Nuklease resistent).



**Abb. 1.2.3.6.1:**

Die unterschiedlichen Basensequenzen der verwendeten iODN's.

**Abb. 1.2.4.1:**

Schematische Darstellung der TLR-Signalwege. Es werden der MyD88-abhängige und der MyD88-unabhängige Signalweg unterschieden. Beide aktivieren die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B sowie verschiedene Interferon-regulierende Faktoren (IRF3, IRF5, IRF7) und induzieren so die Freisetzung verschiedener Zytokine, sowie die Bildung von Adhäsionsmolekülen.

**Abb. 1.3.1:**

Dendritische Zellen.

**Abb. 1.3.1.1:**

Verschiedene Ursprünge der dendritischen Zellen (DC's).

**Abb. 1.3.4.1:**

Reifung der dendritischen Zellen.

**Abb. 1.3.7.1:**

Die Plastizität der dendritischen Zellen.

**Abb. 1.4.1.1:**

T-Zell-Differenzierung.

**Abb. 1.4.2.1:**

T-Zell-Aktivierung durch reife DC's.

**Abb. 2.2.5.1:**

Schematische Darstellung der FACS-Messung. Die fluoreszenzmarkierten Zellen werden mit dem Probenstrom in die Messzelle geleitet. Der Hüllstrom beschleunigt die Zellen und führt sie einzeln hintereinander in die Mitte des Probenflusses zur Messkapillare (hydrodynamische Fokussierung). Wenn die Zelle die Lichtquelle passiert, wird ein

Fluorochrom angeregt und als Emissionslicht zum Photomultiplier geleitet. Das Lichtsignal wird verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Der Computer berechnet angehende Signale und zeigt diese digital an (Histogramm, *Dot Plot*).

#### **Abbildung 2.2.6.1:**

Schematische Darstellung des CFDA-SE-Labeling und der Verteilung des CFSE auf die Tochterzellen. **A** Im ersten Labelingschritt diffundiert CFDA-SE durch die Zellmembran, danach wird es durch Esterasen gespalten und das fluoreszierende CFSE kann nicht mehr zurückdiffundieren. **B** Bei einer Zellteilung wird das intrazellulär vorhandene CFSE gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Die dadurch bedingte niedrigere Fluoreszenz der proliferierten Zellen lässt sich am Durchflusszytometer messen.

#### **Abb. 2.2.8.1:**

Als Beispiel abgebildet ist eine Probenmessung mit den 6 im Kit enthaltenen *Beads*. Gemessen wurden die Fluoreszenz-Intensitäten mit dem FL3-Detektor (Abszisse). Die quantitative Konzentration der einzelnen Zytokine ist auf der Ordinate dargestellt.

#### **Abb. 3.1.1:**

R848 verändert dosisabhängig die Differenzierung der aus Monozyten expandierten dendritischen Zellen (DC's). FACS-Analyse eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3 µM – 300 nM R848 über 5 Tage.

**A** Färbung der MoDC's mit FITC anti-human CD14 und APC anti-human CD1a; **B** Färbung der 3 µM R848-DC's s.o.; **C** Färbung der 750 nM R848-DC's s.o.; **D** Färbung der 300 nM R848-DC's s.o.. Die entsprechenden Isotypkontrollen wurden mitgeführt.

#### **Abb. 3.1.2:**

R848 verändert dosisabhängig die Differenzierung der aus Monozyten expandierten dendritischen Zellen (DC's). Graphische Darstellung der z.T. beispielhaft dargestellten FACS-Analysen.

**A** CD14-Expression (%) und **B** CD1a-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3 µM – 300 nM R848.

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen  $n = 4$ .

★  $p < 0,05$  versus MoDC's (Kontroll-DC's) (*two-tailed t-test*).

#### **Abb. 3.2.1.1:**

Gardiquimod und R848 im Vergleich. Gardiquimod als spezifischer TLR7-Ligand verändert im Gegensatz zu R848 die Differenzierung der aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (MoDC's) nicht. FACS-Analyse eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 0,1 – 1  $\mu\text{g/ml}$  (0,319 – 3,19  $\mu\text{M}$ ) Gardiquimod bzw. 3  $\mu\text{M}$  R848 über 5 Tage.

**A** Isotypkontrolle der MoDC's; **B** Färbung der MoDC's mit FITC anti-human CD14, APC anti-human CD1a, PE anti-human HLA-DR; **C** Färbung der 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (0,319  $\mu\text{M}$ ) Gardiquimod-DC's s.o.; Isotypkontrolle 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (0,319  $\mu\text{M}$ ) Gardiquimod-DC's siehe MoDC's; **D** Färbung der 1  $\mu\text{g/ml}$  (3,19  $\mu\text{M}$ ) Gardiquimod-DC's s.o.; Isotypkontrolle der 1  $\mu\text{g/ml}$  (3,19  $\mu\text{M}$ ) Gardiquimod-DC's siehe MoDC's; **E** Isotypkontrolle der 3  $\mu\text{M}$  R848-DC's; **F** Färbung der 3  $\mu\text{M}$  R848-DC's s.o..

#### **Abb. 3.2.1.2:**

Gardiquimod und R848 im Vergleich. Gardiquimod als spezifischer TLR7-Ligand verändert im Gegensatz zu R848 die Differenzierung der aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (DC's) nicht. Graphische Darstellung der beispielhaft dargestellten FACS-Analysen.

**A** CD14-Expression (%), **B** CD1a-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 und 0,1 – 1  $\mu\text{g/ml}$  (0,319 – 3,19  $\mu\text{M}$ ) Gardiquimod oder 3  $\mu\text{M}$  R848.

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen  $n = 6$ .

#### **Abb. 3.2.2.1:**

Loxoribine hat keinen Effekt auf die Differenzierung der aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (MoDC's). Als Beispiel eine FACS-Analyse eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 500  $\mu\text{M}$  Loxoribine über 5 Tage.

**A** Färbung der MoDC's mit FITC anti-human CD14 und APC anti-human CD1a; **B** Färbung der mit 500  $\mu\text{M}$  Loxoribine stimulierten MoDC's s.o..

**Abb. 3.2.2.2:**

Loxoribine hat keinen Effekt auf die Differenzierung der aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (MoDC's). Graphische Darstellung der z.T. beispielhaft dargestellten FACS-Analysen.

**A** CD14-Expression (%) und **B** CD1a-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 1 mM – 100  $\mu$ M Loxoribine bzw. der entsprechenden, als neg. Kontrolle dienenden, Mengen DMSO (Lösungsmittel).

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen  $n = 3$ .

**Abb. 3.2.3.1:**

Die veränderte Differenzierung der DC's mit Hilfe von R848 ist TLR8 vermittelt. Graphische Darstellung.

**A** CD14-Expression (%), **B** CD1a-Expression (%), **C** HLA-DR-Expression (%) und **D** HLA-DR-Expression (MFI) der MoDC's (CtrDC) und unterschiedlich inhibierten R848-DC's nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4, iODN 2088, iODN 20958, iODN 20959 mit und ohne R848.

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen  $n = 3$ .

★  $p < 0,05$  versus R848-DC's (*two-tailed t-test*).

**Abb. 3.3.1.1:**

Die Expression von CD86 und HLA-DR der R848-DC's im Vergleich zu der Stimulation mit Gardiquimod. R848-DC's exprimieren in höherem Maße costimulatorische Moleküle als Gardiquimod-DC's und MoDC's. FACS-Analyse eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 oder 1  $\mu$ g/ml (3,19  $\mu$ M) Gardiquimod über 5 Tage.

**A** Färbung der MoDC's, **B** der 1  $\mu$ g/ml (3,19  $\mu$ M) Gardiquimod-DC's und **C** der 3  $\mu$ M R848-DC's mit PE anti-human CD86 und PE anti-human HLA-DR.

**Abb. 3.3.1.2:**

Die Expression kostimulatorischer Moleküle und HLA-DR der R848-DC's im Vergleich zu der Stimulation mit Gardiquimod. R848 blockiert nicht die Differenzierung und Reifung der DC's.

Es entsteht eine andere Zellpopulation. Graphische Darstellung der z.T. beispielhaft dargestellten FACS-Analysen.

**A** CD40-Expression (MFI), **B** CD83-Expression (MFI), **C** CD86-Expression (MFI), **D** HLA-DR-Expression (MFI) und **E** HLA-DR-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 oder 0,1 – 1  $\mu$ g/ml (0,319 – 3,19  $\mu$ M) Gardiquimod über 5 Tage.

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen n = 6.

★  
p < 0,05 versus MoDC's (Kontroll-DC's) (*two-tailed t-test*).

#### **Abb. 3.3.2.1:**

R848-DC's exprimieren CD123. FACS-Analyse eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 oder 1  $\mu$ g/ml (3,19  $\mu$ M) Gardiquimod über 5 Tage.

**A** Färbung der MoDC's, der 1  $\mu$ g/ml Gardiquimod-DC's und der 3  $\mu$ M R848-DC's mit PE anti-human CD123.

#### **Abb. 3.3.2.2:**

R848-DC's exprimieren CD123. Graphische Darstellung der z.T. beispielhaft dargestellten FACS-Analysen.

**A** CD123-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 oder 0,1 – 1  $\mu$ g/ml (0,319 – 3,19  $\mu$ M) Gardiquimod über 5 Tage.

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen n = 6.

#### **Abb. 3.4.1.1:**

Die FOXP3-Expression der MoDC's und der R848-DC's im Vergleich. R848 verändert nicht die intrazelluläre FOXP3-Expression. Graphische Darstellung.

FOXP3-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848.

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen n = 3.

**Abb. 3.4.2.1:**

Die CD122-Expression der R848-DC's im Vergleich. R848 verändert nicht die CD122-Expression. Graphische Darstellung.

CD122-Expression (%) der isolierten Monozyten nach 5 Tagen Stimulation mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 oder nur mit R848 bzw. ganz ohne Stimuli (Monozyten).

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen n = 4.

**Abb. 3.5.1:**

Die Expression der Oberflächenmoleküle der R848-DC's im Vergleich. Graphische Darstellung der FACS-Analyse eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 für 3 Tage; danach dreimaliges Waschen der Zellen mit DC-Medium und anschließend wieder 3 Tage mit bzw. ohne GM-CSF und IL-4 in Kultur genommen.

**A** CD14-Expression (%), **B** CD1a-Expression (%), **C** CD123-Expression (%), HLA-DR-Expression (MHC-II) (%) und **D** HLA-DR-Expression (MHC II) (MFI) der isolierten Monozyten nach 6 Tagen.

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen n = 3.

**Abb. 3.6.1:**

FACS-Analyse der T-Zell-Proliferation eines Spenders nach Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator und anschließender Stimulation der Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 über 3 Tage. Ansetzen der MLR mit den Stimulatorzellen und frisch isolierten, mit 1  $\mu$ M CFDA SE markierten, allogenen PBMC's (Responderzellen) in der Ratio 1 + 4 für 5 – 7 d.

**A** Färbung der MoDC's (Stimulatorzellen) mit den markierten Responderzellen (Ratio 1+4) mit APC anti-human CD11b, APC-H7 anti-human CD4, Pacific Blue anti-human CD3; **B** Färbung der 3  $\mu$ M R848-DC's (Stimulatorzellen) mit den markierten Responderzellen (Ratio 1+4) s.o..

**Abb. 3.6.2:**

R848-DC's induzieren eine bessere T-Zell-Proliferation als MoDC's. Graphische Darstellung der z.T. beispielhaft dargestellten FACS-Analysen.

**A** Relative CD3- (%), **B** CD4- (%) und **C** CD8-Proliferation (%) der Responderzellen induziert durch CtrDC (MoDC's) und R848-DC's über 5 – 7 Tage. Als Negativ-Kontrolle dienten unstimulierte Responderzellen.

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen  $n = 5$ .

★  $p < 0,05$  versus MoDC's (CtrDC's) (*two-tailed t-test*).

#### **Abb. 3.7.1:**

R848-DC's produzieren verschiedene Zytokine mit immunregulatorischen Funktionen. Beispielhafte Darstellung einer CBA FACS-Analyse.

Nach der Monozyten-Separation durch den AutoMACS™ Separator wurden die Zellen mit GM-CSF/IL-4 mit und ohne 3  $\mu$ M R848 für 3 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen der Zellen mit DC-Medium und dann wurden die Zellen nach 12h bzw. 72h Ruhen mit 2  $\mu$ g/ml LPS bzw. 3  $\mu$ g/ml CpG 2006 für jeweils 24h restimuliert.

#### **Abb. 3.7.2:**

R848-DC's produzieren nach Restimulation mit LPS verschiedene Zytokine mit immunregulatorischen Funktionen. Graphische Darstellung der beispielhaft dargestellten CBA-Analysen.

**A** IL-12p70-Produktion (pg/ml); **B** TNF- $\alpha$ -Produktion (pg/ml); **C** IL-10-Produktion (pg/ml); **D** IL-6-Produktion (pg/ml) und **E** Verhältnis TNF- $\alpha$  zu IL-10 nach 12 bzw. 72 h Ruhen und folgender Restimulation der CtrDC (MoDC's) und der R848-DC's mit 2  $\mu$ g/ml LPS.

Mittelwerte  $\pm$  stat. Standardfehler; Anzahl der Stimulationen  $n = 4$ .

★  $p < 0,05$  versus CtrDC's (MoDC's) (*friedman test*).

## 9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Adaptorprotein
APC	Allophycocyanin
APC	<i>antigen presenting cell</i>
BDCA	<i>blood dendritic cell antigen</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CCL	<i>CC motif receptor ligand</i>
CCR	<i>CC motif receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFDA-SE	Carboxyfluoreszeindiazetat-Succinimidylester
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succinimidylester
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COX2	Cyclooxygenase 2
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin



CSF	<i>colony stimulating factor</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
DAG	Diacylglycerol
DC	<i>dendritic cell</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	<i>double stranded</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescent-activating cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Fcy-Rezeptor	niedrig affiner Rezeptor für das Fc-Fragment des IgG
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz Kanal
FOXP3	<i>Forkhead box protein P3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
g	Gravidität
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
h	Stunde
HEPES	2-(N-Hydroxyethylpiperazin)-2'-Ethansulfonsäure

HIV	humanes Immundefizienz Virus
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
iDC's	gewebsständige unreife dendritische Zellen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iODN's	inhibitorische synthetische Oligonucleotide
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IRAK	<i>Interleukin-1 rezeptor associated kinase</i>
IRF	<i>IFN-regulatory factor</i>
JAK	Janus-aktivierte Kinase
l	Liter
LC's	Langerhanszellen
LPS	Lipopolysaccharid
LRR's	Leucin-reiche Abschnitte
LTA	Lipoteichonsäure
M	Molar (mol/l)
m	Meter
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
MACS	<i>magnetic activating cell sorting</i>
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
mDC's	myeloide dendritische Zellen
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIIC's	<i>MHC-II-rich-compartiments</i>
MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein
min	Minute
MLR	<i>mixed Lymphocyte-reaction</i>
MoDC's	<i>monocyte derived dendritic cells</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
μ	Mikro ( $10^{-6}$ )
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLR's	<i>Nod-like receptors</i>
ODN's	synthetische Oligodesoxynucleotide
p	Piko ( $10^{-12}$ )
PAMP's	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
Pam3Cys	synthetisches tripalmitoyliertes Lipopeptid
PBMC's	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pDC's	<i>plasmacytoid dendritic cells</i>
PE	Phycoerythrin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositoldiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PRR's	<i>pattern recognition receptors</i>
rh GM-CSF	rekombinantes humanes GM-CSF
RIP	Rezeptorinteragierendes Protein
RLH's	<i>RIG-like helicases</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RT	Raumtemperatur
sIL-6R	löslicher Interleukin-6-Rezeptor
ss	<i>single stranded</i>
SSC	<i>side scatter</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBK	TANK-bindende Kinase
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>

T <sub>H1</sub> -Zellen	T-Helferzelle 1
T <sub>H2</sub> -Zellen	T-Helferzelle 2
TIR	<i>Toll-/IL-1 receptor domain</i>
TIRAP	<i>Toll-/IL-1 receptor (TIR)-domain containing adaptor protein</i>
TLR's	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	<i>tumor-necrosis factor</i>
TRAF	<i>tumor-necrosis factor-associated-factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor inducing IFN-<math>\beta</math></i>
tRNA	<i>transfer RNA</i>
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
°C	Grad Celsius
%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gregor Bein und Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein für die Bereitstellung des interessanten Themas und der Schaffung optimaler Bedingungen zur Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein für die vielen fachlichen Anregungen, die stete Diskussionsbereitschaft und die umfassende Betreuung und Förderung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Tillmann Rümenapf möchte ich für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie für seine freundliche Unterstützung und stete Gesprächsbereitschaft danken.

Vielen Dank auch an Frau Angelika Nockher, Frau Gaby Haley, Frau Dr. Nelli Baal und Frau Christina Lang, die mich nicht nur fachkundig in die Methoden eingeführt haben, sondern mir auch bei allen Problemen mit Rat, Tat und Fachwissen zur Seite standen.

Außerdem vielen Dank meinen Zimmergenossinnen Frau Dr. Sabrina Immecke, Frau Juliane Bechtel und Frau Dr. Natalia Soriano-Sarabia für die immerwährende Diskussionsbereitschaft und Hilfe.

Von Herzen danke ich meinen Eltern für all die Unterstützung vor und während der Erstellung meiner Dissertation.

Besonderen Dank an meinen Mann Andreas, der mir stets mit Verständnis und Geduld zur Seite stand und ein dickes Dankeschön an unseren Sohn Luis, der abends immer so schön geschlafen hat, und mir so ermöglichte die Dissertation fertigzustellen.

## 11 Publikationen

Immecke, S. N., Wilhelm, J., Bechtel, J., Knoche, A., Bein, G., Hackstein, H. (2011).

The cyclophilin-binding agent Sanglifehrin A is a novel dendritic cell chemokine and migration inhibitor. *PLoS One*. **6(3)**: e 18406

### Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Hackstein, H., Knoche, A., Nockher, A., Poeling, J., Kubin, T., Jurk, M., Vollmer, J., Bein, G. (2011).

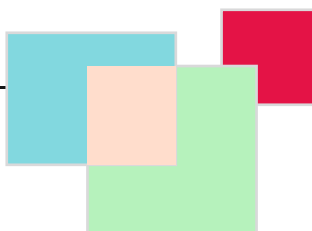
The TLR7/8 ligand resiquimod targets monocyte-derived dendritic cell differentiation via TLR8 and augments functional dendritic cell generation. *Cell Immunol*. **Vol. 271**: 401-412

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Angela Knoche





*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5889-0



9 78 3 835 19 5889 0